



HAL
open science

**Tumeurs intra-thoraciques : mutations oncogéniques et
problématiques cliniques : prédisposition génétique au
cancer broncho-pulmonaire chez le patient non-fumeur :
hétérogénéité inter- et intra- tumorale des cancers
broncho-pulmonaires : étude génomique intégrative des
tumeurs épithéliales du thymus**

Nicolas Girard

► **To cite this version:**

Nicolas Girard. Tumeurs intra-thoraciques : mutations oncogéniques et problématiques cliniques : prédisposition génétique au cancer broncho-pulmonaire chez le patient non-fumeur : hétérogénéité inter- et intra- tumorale des cancers broncho-pulmonaires : étude génomique intégrative des tumeurs épithéliales du thymus. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10142 . tel-00926538

HAL Id: tel-00926538

<https://theses.hal.science/tel-00926538>

Submitted on 9 Jan 2014

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.

THÈSE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE

ÉVOLUTION ÉCOSYSTEMES MICROBIOLOGIE MODÉLISATION

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 5 septembre 2011

par

Nicolas GIRARD

Tumeurs intra-thoraciques:

Mutations oncogéniques et problématiques cliniques

Prédisposition génétique au cancer broncho-pulmonaire chez le patient non-fumeur

Hétérogénéité inter- et intra- tumorale des cancers broncho-pulmonaires

Etude génomique intégrative des tumeurs épithéliales du thymus

Directeur de thèse: Monsieur le Professeur Jean-François MORNEX

JURY

| | |
|--|-------------------|
| Madame le Professeur Elisabeth BRAMBILLA | Président du Jury |
| Monsieur le Professeur Jacques CADRANEL | Rapporteur |
| Monsieur le Docteur Philippe LASSALLE | Rapporteur |
| Monsieur le Professeur Jean-François CORDIER | |
| Monsieur le Docteur Pierre HAINAUT | |

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Secrétaire Général

M. A. Bonmartin

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. le Professeur J-F. Mornex

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur: M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur: M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur: M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur: M. le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur: M. le Professeur Y. Matillon

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur: M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur: M. le Professeur F. Gieres

Département Biologie

Directeur: M. le Professeur F. Fleury

Département Chimie Biochimie

Directeur: Mme le Professeur H. Parrot

Département GEP

Directeur: M. N. Siauve

Département Informatique

Directeur: M. le Professeur S. Akkouche

Département Mathématiques

Directeur: M. le Professeur A. Goldman

Département Mécanique

Directeur: M. le Professeur H. Ben Hadid

Département Physique

Directeur: Mme S. Fleck

Département Sciences de la Terre

Directeur: Mme le Professeur I. Daniel

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur: M. C. Collignon

Observatoire de Lyon

Directeur: M. B. Guiderdoni

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Directeur: M. P. Fournier

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur: M. G. Pignault

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur: M. le Professeur C. Coulet

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur: M. le Professeur J-C. Augros

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur: M. R. Bernard

Aux membres du Jury,

Madame le Professeur Elisabeth BRAMBILLA,

Votre capacité à analyser avec acuité les travaux les plus divers et l'étendue de vos connaissances scientifiques sont une richesse pour l'évaluation de ce travail. Votre rôle dans mon intégration au *Memorial* a été déterminant. Je suis très honoré que vous présidiez ce jury.

Monsieur le Professeur Jean-François MORNEX,

Je vous remercie de votre accompagnement dans la mise en œuvre et la finalisation de cette thèse. J'admire votre approche scientifique et médicale de la pneumologie. Je vous remercie de votre soutien pour mon intégration dans votre laboratoire. Je suis heureux et reconnaissant de votre présence dans ce jury.

Monsieur le Professeur Jacques CADRANEL,

J'admire la qualité de vos travaux scientifiques dans des domaines couvrant l'ensemble de la pathologie respiratoire. Je vous remercie de votre implication dans l'évaluation de cette thèse.

Monsieur le Docteur Philippe LASSALLE,

Je vous remercie de me faire l'honneur de juger ce travail. Croyez en l'expression de ma sincère considération.

Monsieur le Professeur Jean-François CORDIER,

Vous m'avez fait l'honneur de m'accueillir et de m'accorder votre confiance dès mes premiers pas d'interne. Vous m'avez guidé tout au long de ma formation, et avez suivi de façon constante le développement de mes projets de recherche au *Memorial*. Je vous adresse l'expression de ma grande admiration et de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Docteur Pierre HAINAUT,

Je suis sensible à l'intérêt que vous avez porté à ce travail. Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mes juges.

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire du Professeur William PAO, au sein du *Lung Cancer Onco-Genome Group, Human Oncology and Pathogenesis Program*, au *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* à New-York, USA, entre novembre 2007 et octobre 2009.

Je remercie William PAO pour m'avoir fait bénéficier au quotidien de son encadrement scientifique, m'avoir accordé sa confiance pour développer des projets plus personnels, et avoir soutenu la complétion de mes travaux au *Memorial* malgré les contraintes du déménagement de son laboratoire. De ces deux années passées dans un environnement de travail exceptionnel, parmi mille souvenirs, je retiens sa motivation de chaque instant, son enthousiasme pour chaque idée ou projet, et surtout la rigueur scientifique dont les résultats de cette thèse sont témoins.

Je remercie également William TRAVIS pour son soutien continu et son implication personnelle dans la conduite de mes différents projets de recherche.

Je remercie enfin les membres du laboratoire, en particulier Yixuan GONG et Julie CHMIELECKI pour leur aide technique dans la mise au point de mes protocoles expérimentaux. Je remercie tous les membres du *Lung Cancer Onco-Genome Group*, en particulier Mark KRIS, Gregory RIELY, Valerie RUSCH, James HUANG, Marc LADANYI et Maureen ZAKOWSKI.

Si ce document ne porte aujourd'hui qu'un nom, il s'agit pourtant d'une aventure collective, depuis la préparation de ce séjour de recherche jusqu'au retour en France. Je souhaite particulièrement remercier Mesdames les Docteurs Caroline LEROUX et Fabienne ARCHER, qui ont accompagné mes premiers pas au laboratoire pendant mon année de Master Recherche à l'UMR 754. Cette première expérience a été cruciale pour la réussite de mon séjour au *Memorial*.

Je remercie le Professeur Vincent COTTIN, dont la rigueur dans la conduite de travaux scientifiques est un exemple. Vincent, ton soutien a été fondamental depuis mes premiers pas d'interne. Tes conseils dans les phases d'incertitude ont été déterminants. Que cette thèse soit le témoin de ma gratitude.

Je tiens à remercier les associations, sociétés savantes et laboratoires qui ont permis la réalisation matérielle de mon séjour: Comité Jean Walter-Zellidja de l'Académie Française, Collège des Enseignants de Pneumologie/Astra-Zeneca, Institut Lilly, Fédération Nationale des Centre de Lutte Contre le Cancer/Fondation de France, Fondation Philippe, et Ministère des Affaires Etrangères.

Je remercie les membres du service de Pneumologie de l'hôpital Louis Pradel et de l'UMR 754 qui m'accompagnent depuis longtemps déjà...

A Nathalie,

A Léonie et Raphaël,

A mes parents, mes frères,

A mes amis,

RÉSUMÉ

Les protéines kinases de la voie de signalisation de l'*Epidermal Growth Factor Receptor* sont l'objet d'une dérégulation au cours des cancers broncho-pulmonaires. Les gènes encodant ces protéines sont porteurs de mutations oncogéniques mutuellement exclusives induisant la transformation tumorale des cellules de l'épithélium respiratoire. Ces mutations définissent autant de sous-groupes moléculaires spécifiques caractérisés sur le plan clinique, histologique, et biologique.

Notre travail a consisté en l'étude de ces mutations dans trois situations cliniques spécifiques, les cancers broncho-pulmonaires du non-fumeur, les cancers broncho-pulmonaires multiples, et les tumeurs thymiques. L'évaluation des polymorphismes génétiques chez les patients non-fumeurs atteints de cancer broncho-pulmonaire suggère le rôle de gènes spécifiques, différents de ceux impliqués chez le patient fumeur. L'étude génomique des cancers broncho-pulmonaires multiples montre la possibilité d'utiliser les mutations oncogéniques pour évaluer le degré de clonalité des lésions tumorales multiples, avec une corrélation significative avec leur analyse histo-pathologique détaillée. L'analyse génomique intégrative des tumeurs thymiques indique l'existence de sous-groupes moléculaires spécifiques, corrélés à la classification histologique, et caractérisés par des mutations oncogéniques prédictives de l'efficacité de certains traitements ciblés.

Nos données illustrent les principes de la médecine personnalisée en oncologie thoracique, consistant en l'analyse des caractéristiques moléculaires de chaque tumeur individuelle, pour permettre une meilleure personnalisation de la prise en charge des patients.

MOTS-CLES

Cancer broncho-pulmonaire, Thymome, Histologie, Biologie moléculaire, Mutation, *Epidermal Growth Factor Receptor*, KIT, Médecine personnalisée

LABORATOIRE DE RATTACHEMENT

UMR 754 « Rétrovirus et Pathologie Comparée »,
Université Claude Bernard - Lyon 1
50 avenue Tony Garnier 69007 LYON

ABSTRACT

Oncogenic mutations may be identified in several genes of the *Epidermal Growth Factor Receptor* signaling pathway in non-small cell lung cancer. These mutations are transforming for epithelial cells of the respiratory tract through deregulation of the encoded proteins. These mutations are mutually exclusive and thus define molecular subsets of lung cancer with specific clinical, histological, and biological relevance.

Here we integrated the use of mutation genotyping for the analysis of 3 specific clinical issues, including lung cancer occurring in never-smokers, multiple lung cancers, and thymic malignancies. Our results indicate that genetic polymorphisms in never-smokers with lung cancer differ from those observed in smokers. Genomic profiling of multiple lung cancers suggests the feasibility of mutational profiling as a surrogate marker to evaluate the clonal relationships among multiple lung tumors, with a strong correlation with comprehensive histologic subtyping. Integrated genomic analysis of thymic malignancies identified specific molecular subsets, associated with histologic subtypes and oncogenic mutations predicting response to specific inhibitors.

Taken together, our results illustrate the concept of personalized medicine in thoracic oncology, consisting of the individual analysis of molecular features of tumors to better tailor the therapeutic management of patients.

KEY-WORDS

Lung cancer, Thymoma, Histology, Molecular biology, Mutation, *Epidermal Growth Factor Receptor*, KIT, Personalized Medicine

SOMMAIRE

| | |
|------------------------|----|
| RÉSUMÉ..... | 11 |
| RÉSUMÉ EN ANGLAIS..... | 13 |
| SOMMAIRE..... | 15 |

PREMIERE PARTIE

| | |
|--|-----------|
| Mutations oncogéniques des cancers broncho-pulmonaires..... | 19 |
| I. Epidémiologie des cancers broncho-pulmonaires..... | 21 |
| I.1. Fréquence des cancers broncho-pulmonaires..... | 21 |
| I.2. Classification histologique..... | 21 |
| I.3. Facteurs de risque..... | 21 |
| I.4. Principes de traitement..... | 22 |
| II. <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> et carcinogenèse pulmonaire..... | 23 |
| II.1. Mécanismes de la carcinogenèse pulmonaire..... | 23 |
| II.2. Voie de l' <i>Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)</i> | 23 |
| II.3. Ciblage de la voie de l'EGFR au cours des cancers broncho-pulmonaires..... | 24 |
| II.4. Epidémiologie et conséquences des mutations de l' <i>EGFR</i> | 25 |
| III. Au-delà des mutations de l'<i>EGFR</i>: d'autres mutations oncogéniques..... | 29 |
| III.1. Nouvelles mutations oncogéniques..... | 29 |
| III.2. Mutations secondaires et résistance aux thérapies ciblées..... | 31 |
| IV. Méthodes d'identification des altérations moléculaires oncogéniques..... | 32 |
| IV.1. Analyse des altérations de l'ADN: génomique..... | 32 |
| IV.1.1. Séquençage..... | 32 |
| IV.1.2. Hybridation génomique comparative..... | 33 |
| IV.1.3. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> arrays..... | 33 |
| IV.1.4. Epigénomique..... | 34 |
| IV.2. Analyse des altérations de l'ARN: transcriptomique..... | 34 |
| IV.3. Analyse des altérations des protéines: protéomique..... | 35 |

SECONDE PARTIE

| | |
|--|-----------|
| Prédisposition génétique au cancer broncho-pulmonaire chez le patient non-fumeur..... | 37 |
| I. Problématique du cancer broncho-pulmonaire chez le non-fumeur..... | 39 |
| I.1. Fréquence du cancer broncho-pulmonaire chez le non-fumeur..... | 39 |
| I.2. Caractéristiques cliniques du cancer broncho-pulmonaire chez le non-fumeur..... | 39 |
| I.3. Causes du cancer broncho-pulmonaire chez le non-fumeur..... | 39 |
| I.4. Mutations oncogéniques des cancers broncho-pulmonaires chez le non-fumeur..... | 40 |

| | |
|--|----|
| I.5. Prédilection génétique au cancer broncho-pulmonaire | 40 |
| I.5.1. Données historiques..... | 40 |
| I.5.2. Etudes d'association pan-génomique..... | 40 |
| I.5.3. Prédilection génétique au cancer broncho-pulmonaire chez le non-fumeur..... | 41 |

| | |
|---|-----------|
| II. Travail de recherche: étude des gènes de prédilection au cancer broncho-pulmonaire chez le non-fumeur..... | 42 |
|---|-----------|

| | |
|---|-----------|
| III. Perspectives: données récentes sur la prédilection génétique au cancer broncho-pulmonaire chez le non-fumeur..... | 45 |
|---|-----------|

TROISIÈME PARTIE

| | |
|--|-----------|
| Hétérogénéité inter- et intra-tumorale des cancers broncho-pulmonaires..... | 47 |
|--|-----------|

| | |
|--|-----------|
| I. Problématique de l'hétérogénéité intra- et inter-tumorale des cancers broncho-pulmonaires..... | 49 |
|--|-----------|

| | |
|--|----|
| I.1. Hétérogénéité intra-tumorale des cancers broncho-pulmonaires..... | 49 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| I.2. Hétérogénéité des lésions broncho-pulmonaires pré-tumorales..... | 50 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| I.3. Hétérogénéité inter-tumorale: cancers broncho-pulmonaires multiples..... | 51 |
|---|----|

| | |
|-------------------------------|----|
| I.3.1 Aspects cliniques | 51 |
|-------------------------------|----|

| | |
|-----------------------------|----|
| I.3.1.1. Epidémiologie..... | 51 |
|-----------------------------|----|

| | |
|-----------------------------|----|
| I.3.1.2. Stadification..... | 51 |
|-----------------------------|----|

| | |
|---|----|
| I.3.1.3. Classifications anatomo-cliniques..... | 51 |
|---|----|

| | |
|------------------------------------|----|
| I.3.1.4. Impact thérapeutique..... | 52 |
|------------------------------------|----|

| | |
|---------------------------------|----|
| I.3.2 Données moléculaires..... | 53 |
|---------------------------------|----|

| | |
|--|-----------|
| II. Travail de recherche: analyse génomique, mutationnelle et histologique intégrative de l'hétérogénéité inter- et intra-tumorale..... | 57 |
|--|-----------|

| | |
|--|----|
| II.1. Hétérogénéité inter-tumorale: cancers broncho-pulmonaires multiples..... | 57 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| II.1.1. Evaluation de la clonalité à partir des mutations oncogéniques de l' <i>EGFR</i> et de <i>KRAS</i> | 57 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| II.1.2. Evaluation de la clonalité à partir des profils génomiques..... | 59 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| II.1.3. Analyse histo-pathologique détaillée..... | 61 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| II.1.4. Hétérogénéité inter-tumorale: perspectives..... | 63 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| II.2. Hétérogénéité intra-tumorale..... | 65 |
|---|----|

| | |
|---------------------------|----|
| II.2.1. Introduction..... | 65 |
|---------------------------|----|

| | |
|--|----|
| II.2.2. Collecte des échantillons..... | 65 |
|--|----|

| | |
|---------------------------------------|----|
| II.2.3. Analyse des échantillons..... | 66 |
|---------------------------------------|----|

| | |
|------------------------|----|
| II.2.4. Résultats..... | 67 |
|------------------------|----|

| | |
|---------------------------|----|
| II.2.5. Perspectives..... | 68 |
|---------------------------|----|

QUATRIÈME PARTIE

| | |
|--|-----------|
| Etude génomique intégrative des tumeurs épithéliales du thymus..... | 71 |
| I. Présentation des tumeurs épithéliales du thymus..... | 73 |
| I.1. Caractéristiques générales..... | 73 |
| I.2. Données biologiques..... | 73 |
| II. Travail de recherche: étude génomique intégrative des tumeurs épithéliales du thymus..... | 75 |
| III. Conclusions..... | 77 |
| | |
| <u>PERSPECTIVES</u> | |
| Médecine personnalisée en oncologie thoracique..... | 79 |
| | |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 83 |

PREMIERE PARTIE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE:

Mutations oncogéniques des cancers broncho-pulmonaires

I. Epidémiologie des cancers broncho-pulmonaires

I.1. Fréquence des cancers broncho-pulmonaires

Le cancer broncho-pulmonaire représente la première cause de mortalité par cancer dans le monde, avec plus de 1,2 million de décès annuels [1]. En France, avec plus de 30 000 nouveaux cas par an, le cancer broncho-pulmonaire est le second cancer chez l'homme et le quatrième chez la femme [2]. Si l'incidence et la mortalité de ce cancer sont actuellement 6 fois supérieures chez les hommes, il existe une augmentation continue de ces indicateurs chez les femmes: respectivement 4,5% et 2,9% par an depuis 1980 (contre respectivement 0,6% et 0,7% chez les hommes) [2]. Une accélération de cette tendance est actuellement observée chez les femmes jeunes, et les estimations indiquent que la mortalité par cancer broncho-pulmonaire sera triplée d'ici 2020, dépassant chez les femmes la mortalité des cancers du sein [3].

I.2. Classification histologique

La plupart des cancers broncho-pulmonaires sont des carcinomes (99% des cas), développés à partir de l'épithélium respiratoire des voies aériennes et des alvéoles pulmonaires [4, 5]. Il existe 2 types histologiques principaux de cancer broncho-pulmonaire: les carcinomes à petites cellules (15% des cas) et les carcinomes non à petites cellules (85% des cas), qui regroupent les adénocarcinomes, les carcinomes épidermoïdes, et les carcinomes indifférenciés à grandes cellules [4]. Les travaux présentés dans cette thèse se sont exclusivement intéressés aux cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules.

L'augmentation actuelle de l'incidence globale des cancers broncho-pulmonaires est principalement liée à une augmentation des adénocarcinomes pulmonaires, qui sont devenus le type histo-pathologique le plus fréquent (52% des cas) [5]. La classification histologique des adénocarcinomes broncho-pulmonaires a évolué au cours des dernières années avec la prise en compte des différents aspects architecturaux et cellulaires de ces tumeurs hétérogènes au plan morphologique (**Tableau 1**) [5]. Les adénocarcinomes sont mixtes dans plus de 80% des cas, avec une combinaison de plusieurs sous-types architecturaux: sous-type lépidique (anciennement bronchiolo-alvéolaire), désignant une prolifération de cellules tumorales sans invasion stromale, vasculaire ou pleurale; sous-types papillaires et micro-papillaires, caractérisés par des formations primaires, secondaires et tertiaires pseudo-papillaires invasives qui remplacent l'architecture pulmonaire normale; sous-type acinaire, composé de tubules ou de formation pseudo-glandulaires de cellules cuboïdes ou palissadiques; sous-type solide, avec des cellules polygonales mucineuses. La plupart des adénocarcinomes présentent une composante morphologique prédominante. Plusieurs variants cytologiques - cellules mucineuses, colloïdes, fœtales, entériques - ont également été décrits.

I.3. Facteurs de risque

Parmi les facteurs de risque des cancers broncho-pulmonaires, le tabagisme a un rôle prédominant, étant retrouvé dans 85% des cas chez l'homme et 60% des cas chez la femme [6]. L'évolution de l'incidence et de la mortalité du cancer broncho-pulmonaire reflète l'évolution de la consommation de tabac depuis l'après-guerre, avec une latence comprise entre 10 et 20 ans [3]. Néanmoins, seuls 10% à 15% des fumeurs développent un cancer du poumon, suggérant l'existence d'un polymorphisme génétique qui, à exposition égale, favorise la survenue de ce cancer [6]. En outre, l'association au tabagisme est variable selon les sous-types: alors que les carcinomes à petites cellules surviennent dans 99% des cas chez

des patients fumeurs, les adénocarcinomes avec composante lépidique prédominante apparaissent moins fréquemment associés au tabagisme, suggérant une part plus importante des facteurs génétiques [5].

Tableau 1: Classification multidisciplinaire des adénocarcinomes pulmonaires proposée par l'*International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)*, l'*American Thoracic Society (ATS)*, et l'*European Respiratory Society (ERS)* [5].

| |
|--|
| Preinvasive lesions |
| Atypical adenomatous hyperplasia |
| Adenocarcinoma in situ (≤ 3 cm formerly BAC) |
| Nonmucinous |
| Mucinous |
| Mixed mucinous/nonmucinous |
| Minimally invasive adenocarcinoma (≤ 3 cm lepidic predominant tumor with ≤ 5 mm invasion) |
| Nonmucinous |
| Mucinous |
| Mixed mucinous/nonmucinous |
| Invasive adenocarcinoma |
| Lepidic predominant (formerly nonmucinous BAC pattern, with >5 mm invasion) |
| Acinar predominant |
| Papillary predominant |
| Micropapillary predominant |
| Solid predominant with mucin production |
| Variants of invasive adenocarcinoma |
| Invasive mucinous adenocarcinoma (formerly mucinous BAC) |
| Colloid |
| Fetal (low and high grade) |
| Enteric |

I.4. Principes de traitement

Le traitement actuel des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules repose sur la chirurgie lorsque la tumeur est résécable (moins de 20% des cas), sur la radiothérapie en cas de tumeur localement avancée non résécable, et sur la chimiothérapie en cas de tumeur métastatique. Malgré l'association séquentielle et/ou concomitante de ces modalités thérapeutiques et les optimisations techniques de ces procédures, le taux de survie global des cancers bronchiques non à petites cellules est inférieur à 20% à 5 ans, soit du fait d'une résistance de la tumeur au traitement, soit du fait de récurrences locales et/ou systémiques précoces. En cas de tumeur métastatique au diagnostic, la survie ne dépasse pas 15 mois avec les protocoles les plus récents de poly-chimiothérapie [7].

Au total, les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules sont des tumeurs fréquentes et de mauvais pronostic. Si la plupart de ces tumeurs sont liés au tabagisme, l'augmentation de leur incidence, et notamment des adénocarcinomes chez les non-fumeurs, indique une diversité génétique que les classifications histo-pathologiques ne mettent que partiellement en évidence. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques individualisées sur les caractéristiques moléculaires de ces tumeurs représente ainsi un enjeu majeur en cancérologie thoracique.

II. *Epidermal Growth Factor Receptor* et carcinogenèse pulmonaire

II.1. Mécanismes de la carcinogenèse pulmonaire

Les avancées obtenues depuis une quinzaine d'années dans le domaine de la biologie des cancers permettent une meilleure compréhension des différences moléculaires et génétiques entre cellules non-tumorales et cellules tumorales. Les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules se développent selon un processus multi-étape, caractérisé par une progression de quelques cellules « initiées » par l'acquisition d'altérations génétiques - activation d'oncogènes, inactivation de gènes suppresseurs de tumeur - leur conférant un avantage prolifératif, vers une tumeur invasive [8]. Dans ce processus d'initiation de la cancérogenèse pulmonaire, le tabac joue un rôle mutagène prédominant, et s'associe à une instabilité tissulaire propre à l'épithélium respiratoire, susceptible d'être l'objet de métaplasies et de dysplasies pré-tumorales multifocales [9].

Au cours du développement tumoral, les cellules néoplasiques acquièrent d'autres altérations génétiques - mutations et amplification géniques, pertes alléliques, surexpression et sous-expression géniques - spécifiques à chaque sous-type histo-pathologique [5, 10, 11], et deviennent capables de se multiplier au-delà de leur limite répllicative physiologique, d'éviter la différenciation tissulaire normale, et d'envahir les structures tissulaires périphériques [8, 12]. Considérant l'ensemble des cancers broncho-pulmonaires, les mêmes voies de signalisation intra-cellulaires, régulatrices de la prolifération, de la différenciation, et de la réparation cellulaire, sont donc atteintes par des mécanismes génétiques différents et propres à chaque sous-type tumoral. Profitant de ces différences moléculaires et génétiques entre cellules non-tumorales et cellules tumorales, des thérapies ciblées contre des voies spécifiquement impliquées dans la prolifération et la survie des cellules tumorales, peuvent être développées.

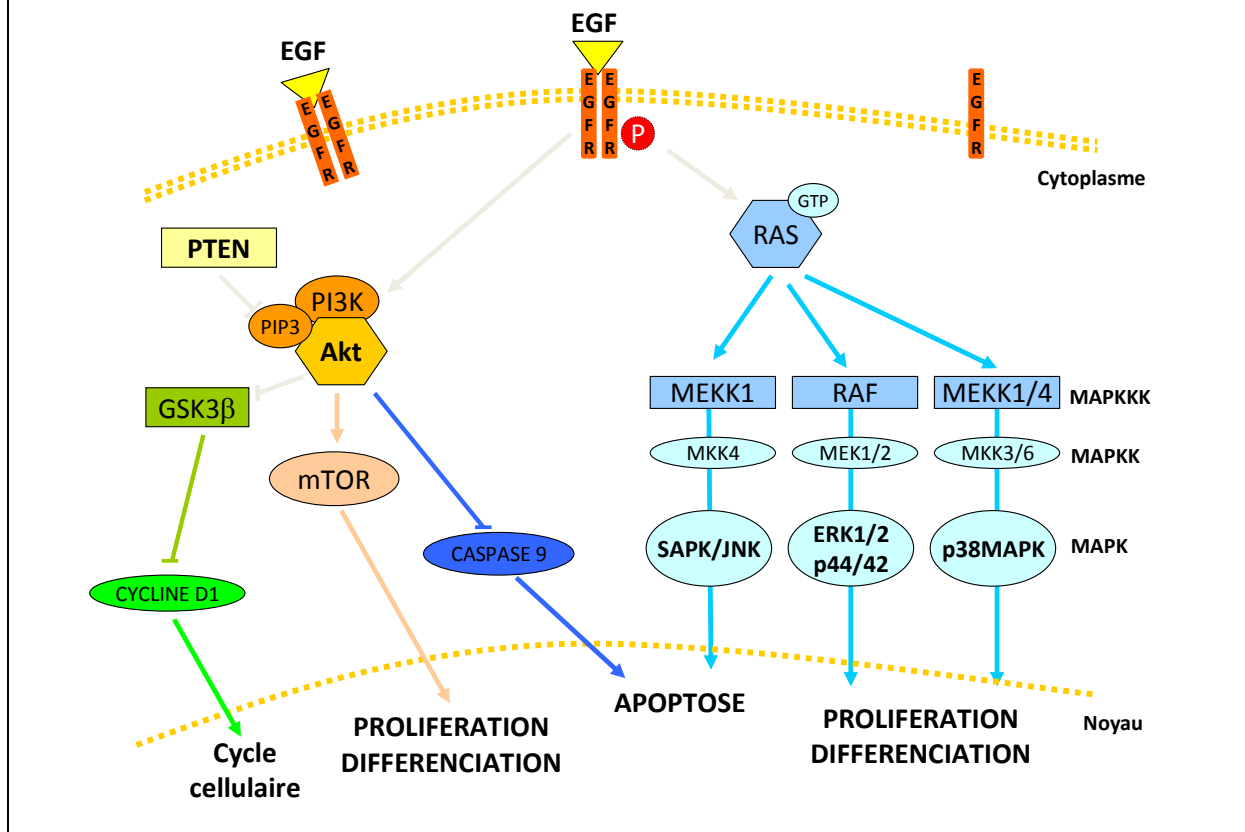
Dans les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules, les 3 principales altérations moléculaires des cellules tumorales sont les mutations inactivatrices de *TP53*, encodant un facteur de transcription assurant l'intégrité génomique lors de la division cellulaire, la dérégulation de la voie P16/RB contrôlant la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire, et l'activation du récepteur à l'*Epidermal Growth Factor* (EGF), conduisant à une prolifération cellulaire incontrôlée [8].

II.2. Voie de l'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR)

Le récepteur à l'EGF (EGFR) est une glycoprotéine membranaire de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase, permettant la transmission d'un signal extracellulaire vers le cytoplasme cellulaire. La fixation de son ligand principal, EGF, au niveau du domaine extracellulaire induit une homo- ou une hétéro-dimérisation avec un autre récepteur trans-membranaire à activité tyrosine kinase, permettant l'activation par autophosphorylation du domaine intra-cytoplasmique (**Figure 1**).

En aval, cette phosphorylation induit le recrutement en position sous-membranaire de nombreuses protéines de transduction du signal comme Grb2, SOS et PIP3, qui permettent l'activation de 2 voies principales de transduction du signal: la voie RAS/MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) et la voie PI3K (*Phospho-Inositide-3 Kinase*)/AKT. Ces voies permettent une régulation et une amplification du signal EGFR, et contrôlent les processus de différenciation, de prolifération, d'apoptose, et de survie cellulaire [13, 14].

Figure 1: Les voies de transduction du signal sous-jacentes à l'EGFR sont la voie RAS/MAPK et la voie PI3K/AKT. Activée par RAS, la cascade des MAPK comprend 3 niveaux: les MAPKKK (*MAPK Kinase Kinase*), dont RAF, phosphorylent les MAPKK (*MAPK Kinase*) comme MEK1/2, elles-mêmes activant les MAPK p44/42 (ERK1/2), p38 et SAPK/JNK. La voie PI3K/AKT contrôle la dégradation de la cycline D1 responsable de l'entrée en phase S, bloque l'apoptose *via* le contrôle des caspases, et régule la croissance cellulaire en activant mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*). AKT est activé par la kinase PI3K et inhibé par PTEN, via la phosphorylation ou la déphosphorylation de PIP3.



II.3. Ciblage de la voie de l'EGFR au cours des cancers broncho-pulmonaires

Une activation de l'EGFR est retrouvée dans 40% à 80% des cas de cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules, quel qu'en soit le type histologique, procédant de plusieurs mécanismes: surexpression (50-80% des cas), mutations activatrices (35-65% des cas), amplification génique (30-40% des cas), et/ou surexpression des ligands (10% des cas) [13, 15-17]. L'activation de la voie de l'EGFR entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire et une diminution de l'apoptose, conduisant à une croissance tumorale, mais aussi à une néo-angiogenèse et à une stimulation des processus d'invasion tumorale [14]. Ces phénomènes sont médiés par l'activation des protéines sous-jacentes à l'EGFR. Ainsi, AKT est activé dans 50% à 80% des cas de carcinome broncho-pulmonaire non à petites cellules, PTEN est inhibé dans 45% à 75% des cas, et ERK1/2 est activé dans 30% à 70% des cas [14, 15, 18].

La fréquence de l'activation de l'EGFR au cours des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules a conduit au développement d'agents pharmacologiques ciblés à type d'inhibiteurs pharmacologiques sélectifs de la tyrosine kinase de l'EGFR (TKIs), parmi lesquels deux ont obtenu une autorisation de mise sur le marché: le gefitinib (IRESSA®,

AstraZeneca, Macclefields, Royaume-Uni) et l'erlotinib (TARCEVA®, Roche, Basel, Suisse). Les premiers essais cliniques de phase I et II avec ces agents avaient mis en évidence, en troisième ligne de traitement, des taux de réponse globale compris entre 8% et 28%, similaires à ceux observés avec les chimiothérapies conventionnelles [19, 20].

Contrairement aux cancers du sein traités avec le trastuzumab (anticorps monoclonal anti-HER2), l'expression de l'EGFR ou de sa forme phosphorylée (P-EGFR) par la tumeur n'apparaissent pas comme des facteurs prédictifs constants de la réponse à ces inhibiteurs [21]. Au contraire, certaines séries de patients avaient mis en évidence l'existence de facteurs prédictifs cliniques de l'efficacité de ces agents: le sexe féminin, l'origine asiatique, l'absence de tabagisme, et le type histologique d'adénocarcinome ou de carcinome bronchiolo-alvéolaire [22]. En 2004, plusieurs équipes, dont celle de W. Pao au *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*, ont montré que ces constatations cliniques correspondaient au plan moléculaire à l'existence de mutations activatrices du domaine tyrosine kinase de l'*EGFR*, présentes dans 10% des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules, et plus fréquentes chez les femmes (40% *versus* 9% chez les hommes), les patients asiatiques (29% *versus* 8% pour les autres ethnies), non-fumeurs (46% *versus* 9% chez les fumeurs), ou ayant un adénocarcinome (30% *versus* 2% en cas d'autre type histologique de carcinome non à petites cellules), et chez les répondeurs aux TKIs (81% *versus* 2% chez les non-répondeurs) (**Figure 2a**) [23-25].

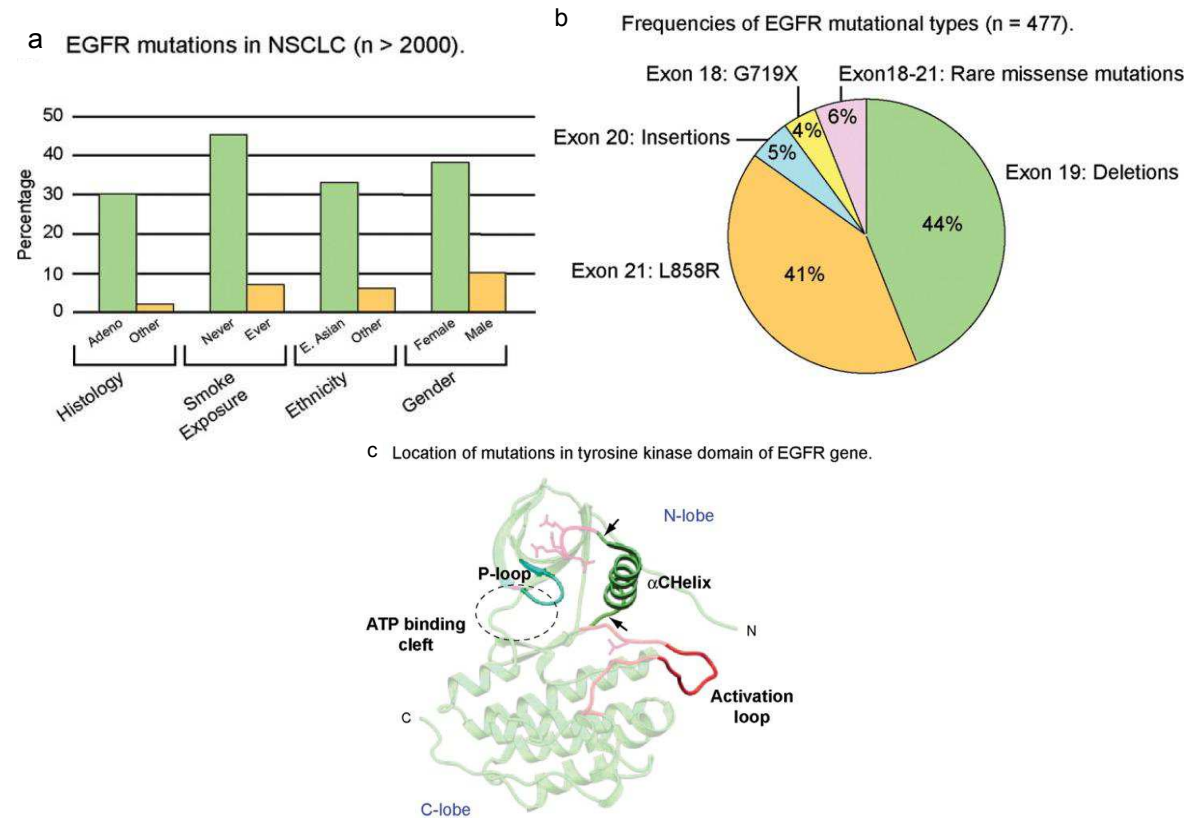
II.4. Épidémiologie et conséquences des mutations de l'*EGFR*

Les mutations de l'*EGFR* sont d'origine somatique, dominantes, et apparaissent précocement au cours de la carcinogenèse pulmonaire, étant retrouvées dans les lésions pré-invasives d'adénocarcinome broncho-pulmonaire comme les hyperplasies adénomateuses atypiques [26]. Ces mutations surviennent spécifiquement dans les 4 premiers exons (exons 18 à 21) du gène *EGFR*, codant pour le domaine tyrosine kinase. Les deux plus fréquentes sont les délétions de 2 à 6 codons dans l'exon 19 (codons 746-752), conservant le cadre de lecture (44% des cas), et la substitution L858R dans l'exon 21 (41% des cas). Des mutations ponctuelles dans l'exon 18 (codon 719), plus rares, peuvent être observées (**Figure 2b**) [27].

Toutes ces mutations entraînent une activation constitutive de la kinase de l'EGFR par modification de la conformation du domaine de fixation de l'Adénosine-Tri-Phosphate (ATP), substrat de la phosphorylation de la tyrosine, créant une ouverture permanente du site de fixation aux protéines sous-jacentes de transduction du signal (**Figure 2c**) [27]. Le récepteur à l'EGFR est donc constitutivement activé. Les TKIs, initialement synthétisés pour inhiber l'EGFR sauvage, se fixent sur le même site que l'ATP ; ainsi, les mutations activatrices du domaine tyrosine kinase stabilisent la fixation des TKIs, qui entrent en compétition avec l'ATP et inhibent l'activation des protéines sous-jacentes.

Les TKIs entraînent ainsi dans les cellules porteuses de mutation activatrice de l'*EGFR* une inhibition des médiateurs AKT et ERK1/2, sous-jacents à l'EGFR; cette inhibition n'est pas retrouvée en l'absence de mutation de l'*EGFR*, ce qui indique l'existence d'une dépendance exclusive de AKT et ERK1/2 à l'EGFR muté, au détriment d'autres récepteurs transmembranaires sus-jacents susceptibles de les activer [23]. Au plan cellulaire, cette dépendance se traduit par une « addiction oncogénique » à la voie de signalisation de l'EGFR, dont l'activation est alors suffisante mais aussi nécessaire au développement, au maintien et à la prolifération des cellules tumorales. Cette caractéristique définit le caractère oncogénique des mutations activatrices de l'*EGFR*.

Figure 2: Mutations de l'*EGFR* dans les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules [27]. (a) Les mutations de l'*EGFR* sont plus fréquentes chez les femmes, les asiatiques, les non-fumeurs, et en cas d'adénocarcinome. (b) Fréquence des différentes mutations activatrices de l'*EGFR*. (c) Localisation des mutations au niveau du domaine tyrosine kinase: les flèches indiquent les délétions et les insertions autour de l'hélice alpha; la mutation L858R est localisée au niveau de la boucle d'activation (en rouge) ; le cercle en pointillé indique le site de fixation à l'ATP.



L'*EGFR* apparaît donc réciproquement comme un véritable « talon d'Achille » pour ces cellules tumorales, puisque son inhibition ciblée par des inhibiteurs spécifiques suffit à entraîner leur apoptose [28]. Ce concept d'« addiction oncogénique » se traduit également au plan clinique, en cas de tumeur broncho-pulmonaire présentant une mutation activatrice de l'*EGFR*, par une réponse objective aux TKIs particulièrement rapide et complète (**Figure 3**).

Plusieurs essais cliniques prospectifs randomisés ont validé le concept d'utilisation des TKIs de l'*EGFR* spécifiquement chez les patients dont la tumeur broncho-pulmonaire est porteuse de mutation de l'*EGFR*. Contrairement aux études cliniques initiales conduites dans des populations de patients non sélectionnées, ces essais ont démontré un bénéfice significatif en termes de taux de réponse et de survie sans progression avec le gefitinib, par rapport à la chimiothérapie standard [29, 30]. En première ligne thérapeutique, la survie globale médiane des patients peut ainsi atteindre près de 3 ans. En l'absence de mutation *EGFR* dans le tissu tumoral, l'utilisation du gefitinib est en revanche délétère par rapport à la chimiothérapie [31]. Ces données illustrent la nécessité de sélection des patients sur la base des caractéristiques moléculaires de la tumeur pour utiliser de façon efficace les thérapies ciblées spécifiques d'une voie de signalisation cellulaire. La recherche des mutations de l'*EGFR* a été intégrée en 2009 comme un standard de prise en charge des adénocarcinomes broncho-pulmonaires métastatiques [32].

Figure 3: Rapidité de la réponse radiographique d'un cancer broncho-pulmonaire au gefitinib. A gauche, radiographie thoracique d'une patiente ayant un adénocarcinome pulmonaire bilatéral et résistant à 2 lignes de chimiothérapie conventionnelle, avant début du traitement par gefitinib: il existe des opacités bilatérales. La tumeur était porteuse de la mutation L858R de l'*EGFR*. La patiente était dyspnéique et un traitement par oxygène était nécessaire. A droite, après 10 jours de traitement, l'oxygénothérapie avait été arrêtée, et la radiographie thoracique montrait une disparition complète des opacités tumorales. (photos: W. Pao).



Au total, les mutations de l'*EGFR* sont oncogéniques et définissent un sous-groupe moléculaire, mais aussi clinique et histologique spécifique au sein des cancers broncho-pulmonaires, pour lequel les inhibiteurs de l'*EGFR* permettent une survie significativement supérieure à celle observée avec les traitements standards. Ces mutations représentent ainsi un modèle d'intégration des caractéristiques moléculaires individuelles de la tumeur dans la stratégie de prise en charge des patients atteints de cancer broncho-pulmonaire.

Les différents aspects de la biologie des mutations de l'*EGFR* au cours des cancers broncho-pulmonaires sont présentés et mis en perspective avec d'autres mutations oncogéniques, en particulier du gène *KIT* dans les tumeurs stromales gastro-intestinales, dans le chapitre de livre: **W. Pao, N. Girard. Clinical Applications of Kinase Inhibitors in Solid Tumors. Handbook of Cell Signaling, Second Edition. Editeurs: Bradshaw RA et Denis EA, Oxford Academic Press 2009 ; pp 615-31**

III. Au-delà des mutations de l'*EGFR*: d'autres mutations oncogéniques

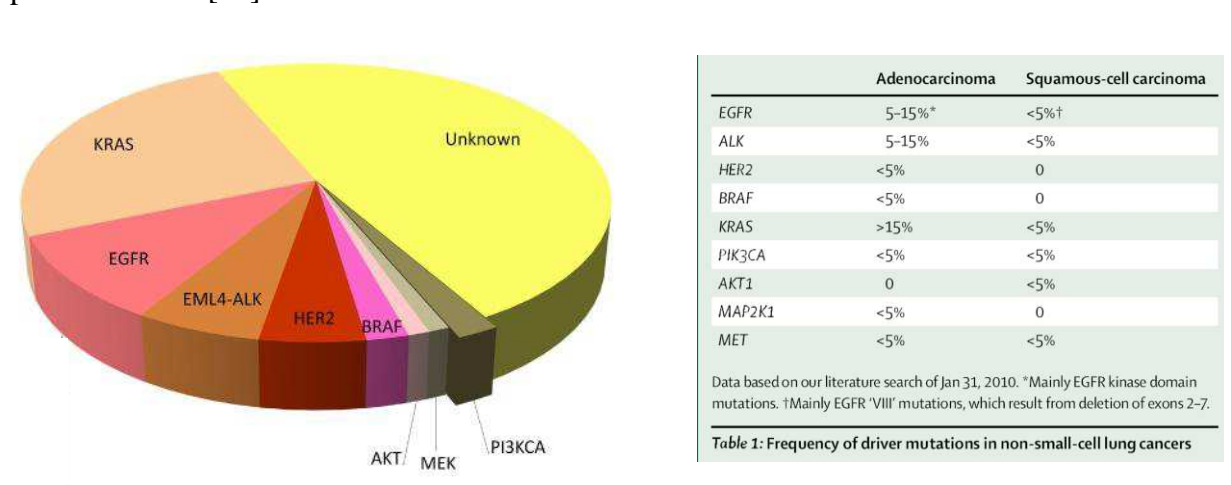
III.1. Nouvelles mutations oncogéniques

Les mutations de l'*EGFR* - prédictives de l'efficacité des TKIs de l'*EGFR* -, n'étant retrouvées que chez 10 à 15% des patients atteints de cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules, 85% à 90% des patients sont non-répondeurs à ces agents. Chez ces patients, des mutations dans le codon 12 de *KRAS*, médiateur sous-jacent à l'*EGFR*, ont été identifiées, dans 20% à 30% des tumeurs. Les mutations de *KRAS*, principalement observées dans des tumeurs de patients fumeurs, sont mutuellement exclusives avec les mutations de l'*EGFR*, et s'associent à une résistance primaire au gefitinib et à l'erlotinib [33]. Les tumeurs porteuses de mutation de *KRAS* correspondent ainsi à un second sous-groupe moléculaire au sein des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules. La dépendance exclusive de ces tumeurs à *KRAS* pour leur développement et leur prolifération, explique alors l'absence d'effet anti-tumoral des TKIs de l'*EGFR*.

Plus récemment, d'autres altérations moléculaires oncogéniques ont été mises en évidence dans les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (**Figure 4**) [34]: mutations de *KRAS*, *HER2*, *BRAF*, *AKT1*, *MEK*, ou *FGFR1* [35] ; translocations *EML4-ALK* et amplification de *MET* [34]. Ces différentes mutations sont pour la plupart observées dans le domaine encodant la tyrosine kinase des protéines correspondantes, et - sauf pour *PI3K* - sont mutuellement exclusives entre elles [34, 36]. Ces mutations définissent ainsi autant de sous-groupes moléculaires spécifiques caractérisés sur le plan biologique, et associés à des spécificités cliniques, histo-pathologiques, et thérapeutiques. Ainsi les traitements ciblés contre une protéine activée par ces mutations oncogéniques seront efficaces uniquement dans le sous-groupe moléculaire correspondant, et inefficaces dans les autres sous-groupes.

L'évaluation de ces nouveaux inhibiteurs spécifiques de tyrosine kinase est maintenant directement couplée à une sélection des patients basée sur la présence de la mutation oncogénique prédictive de leur efficacité [37]. L'identification de ces mutations en routine permettra le développement d'une médecine personnalisée (*Personalized Medicine*), les traitements ciblés - dès lors qu'ils sont disponibles - étant utilisés en fonction du profil oncogénique individuel de la tumeur.

Figure 4: Fréquence des mutations oncogéniques des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules [34].



Les aspects biologiques et cliniques des différentes mutations oncogéniques des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules sont décrits dans l'article: **W. Pao, N. Girard. New Driver Mutations in non-small cell lung cancer. Lancet Oncol 2011;12:175-82**

III.2. Mutations secondaires et résistance aux thérapies ciblées

La résistance secondaire des cancers broncho-pulmonaires porteurs de mutation activatrice de l'*EGFR* aux TKIs de l'*EGFR* d'une part constitue la principale limite clinique de ces thérapeutiques, et d'autre part met en évidence l'existence d'altérations moléculaires et géniques dynamiques au cours de la progression tumorale.

Des mutations « secondaires » de l'*EGFR* sont ainsi retrouvées dans 50% des tumeurs présentant une résistance acquise aux TKIs [38]. La mutation secondaire la plus fréquente est la mutation T790M dans l'exon 20 de l'*EGFR*. Isolée, cette mutation ne confère qu'une activation limitée de l'*EGFR* et un avantage prolifératif modeste ; en revanche, en association avec une mutation activatrice de l'*EGFR*, celle-ci produit une autophosphorylation majeure du domaine tyrosine kinase de l'*EGFR* [39-41]. L'augmentation de l'affinité de la tyrosine kinase pour l'ATP, liée à la mutation T790M, est responsable d'une compétition accrue avec les TKIs de première génération, gefitinib et erlotinib, devenant alors incapables d'inhiber l'activation du récepteur [42].

Les données obtenues grâce au développement de techniques plus sensibles de génotypage indiquent en fait que des clones cellulaires porteurs de la mutation T790M préexistent dès le diagnostic au sein des tumeurs qui présenteront secondairement une résistance acquise aux TKIs, par un effet de pression sélective [43]. La détection d'une mutation secondaire T790M dans la tumeur au diagnostic s'associe ainsi à une survie significativement réduite. Certains résultats contredisent cependant cette théorie. Ainsi il est possible d'induire *in vitro* après traitement intermittent par gefitinib, la survenue de la mutation T790M dans des cellules PC-9 monoclonales, porteuses d'une délétion de l'exon 19 de l'*EGFR*, ce qui suggère l'existence d'un processus mutationnel induit au niveau cellulaire par l'exposition aux TKIs [44]. Des TKIs de seconde génération non compétitifs avec l'ATP sont en cours de développement, et pourraient avoir un intérêt en cas de résistance acquise au gefitinib.

Outre les mutations secondaires de l'*EGFR*, la résistance secondaire aux TKIs de l'*EGFR* est également associée à des altérations oncogéniques survenant sur d'autres protéines à activité kinase. Ainsi l'amplification du gène codant pour le récepteur MET a été identifiée chez 20% des patients présentant une résistance acquise aux TKIs, de façon isolée ou associée à la mutation secondaire de l'*EGFR* T790M [45, 46]. MET est un récepteur à activité tyrosine kinase fonctionnant de façon similaire à l'*EGFR*, dont les ligands sont le *Scatter Cell Factor* (SCF), et l'*Hepatocyte Growth Factor* (HGF) [47]. L'amplification de *MET* a été identifiée par la comparaison des profils génomiques de tumeurs porteuses de mutation activatrice de l'*EGFR*, traitées par TKIs et présentant une résistance secondaire, à des tumeurs porteuses de mutation activatrice de l'*EGFR* et non traitées [45]. Une étude a également mis en évidence l'amplification de *MET in vitro* dans des cellules de lignée porteuses de mutations activatrices de l'*EGFR* et rendues résistantes à l'erlotinib [46]. L'amplification de *MET* pourrait expliquer près de 25% des cas de résistance secondaire aux TKIs. Des inhibiteurs de MET sont actuellement en cours de développement.

Au total, au-delà des mutations activatrices de l'*EGFR*, de nombreuses altérations oncogéniques, potentiellement émergentes sous traitement, peuvent être identifiées sur des gènes encodant des protéines à activité tyrosine kinase. Leur identification et leur caractérisation biologique sont rendues possibles par la mise à disposition de techniques d'analyse génomique globales des cellules tumorales. Le développement de nouveaux agents thérapeutiques ciblés contre ces anomalies est alors possible.

IV. Méthodes d'identification des altérations moléculaires oncogéniques

Au cours des 15 dernières années, l'identification rapide des altérations moléculaires présentes dans les cellules tumorales a été rendue possible par le développement de techniques d'analyse génomique à haut-débit [48]. Ces techniques sont basées sur l'utilisation de puces génomiques (*micro-arrays*), supports constitués d'un ensemble de molécules d'ADN fixées en rangées ordonnées, et qui vont s'hybrider avec l'ADN issu de la tumeur ou l'ADN de référence, marqués par des fluorochromes différents. Chaque spot de la puce va être analysé individuellement par un scanner à très haute résolution, et ce à la longueur d'onde d'excitation des fluorochromes utilisés. Il est alors possible de mesurer, pour chaque sonde représentative d'un allèle du génome, un niveau différentiel d'amplification ou d'expression. Outre l'identification de cibles oncogéniques avec un potentiel thérapeutique, ces techniques produisent des signatures moléculaires, basées sur des combinaisons d'altérations moléculaires spécifiques, et associées à des caractéristiques cliniques, histologiques ou évolutives. Les méthodes d'analyse des données peuvent être non supervisées (clustering hiérarchique) - permettant ainsi de regrouper, sans les définir *a priori*, des échantillons tumoraux porteurs d'anomalies moléculaires similaires -, ou supervisées ; l'objectif est alors de définir une signature propre à des tumeurs regroupées *a priori* sur des critères morphologiques, cliniques ou pronostiques. Du fait de leur fréquence, les adénocarcinomes pulmonaires ont fait l'objet d'une caractérisation génomique intégrative utilisant ces nouvelles technologies.

IV.1. Analyse des altérations de l'ADN: génomique

L'analyse de l'ADN comporte à la fois l'étude de la séquence des gènes (techniques de séquençage) et l'analyse des variations du nombre de copies de ces gènes (techniques d'hybridation génomique comparative).

IV.1.1. Séquençage

Le séquençage est classiquement réalisé selon les principes de la méthode de Sanger, qui consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'un petit oligonucléotide (amorce) complémentaire d'une partie du fragment d'ADN à séquencer. L'élongation de l'amorce est réalisée par des ADN polymérases thermostables. Les quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sont ajoutés, ainsi qu'une faible concentration d'un didésoxynucléotide (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP). Ces didésoxynucléotides, une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, empêchent la poursuite de l'élongation. Cette terminaison se fait spécifiquement au niveau des nucléotides correspondants au didésoxyribonucléotide incorporé dans la réaction. Il en résulte un mélange de fragments d'ADN de tailles croissantes, qui se terminent tous au niveau d'un même nucléotide dans la séquence. Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire, ce qui permet ainsi de repérer la position du nucléotide dans la séquence. La détection des fragments ainsi synthétisés se fait en utilisant des traceurs fluorescents, attachés soit à l'oligonucléotide, soit au didésoxyribonucléotide.

De nouvelles techniques automatiques sont développées afin de séquencer l'ensemble du génome en un temps. Le séquençage en *shotgun* est basé sur le principe de multiples fragmentations aléatoires de l'ADN, avec un séquençage individuel des fragments obtenus, secondairement ordonnés entre eux sur la base des séquences chevauchantes, grâce aux outils informatiques. Le pyro-séquençage permet un séquençage plus rapide, grâce à l'intégration ordonnée des désoxyribonucléotides sur le fragment nucléotidique. La libération d'un

pyrophosphate déclenche un signal lumineux d'intensité proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés, mesurée par un capteur digital. Le système de séquençage 454 LIFE SCIENCES utilise une puce de fragments nucléotidiques sur lesquels l'ADN de l'échantillon testé va s'hybrider et faire l'objet d'un pyro-séquencage. Le système 454 LIFE SCIENCES permet ainsi de séquencer plus de 500 millions de base par réaction [49, 50]. Outre le séquençage d'un génome entier, ce système permet la détection ultra-sensible de mutations présentes dans une faible proportion de cellules tumorales (moins de 1 cellule mutée sur 100 000), un concept appelé séquençage en profondeur. L'augmentation de la résolution du séquençage permet de mieux cibler les altérations présentes dans les cellules tumorales, sans que les résultats soient modifiés par exemple par la présence éventuelle dans l'échantillon de cellules inflammatoires ou immunitaires stromales non-tumorales.

Le re-séquencage systématique de gènes spécifiques a permis la découverte de nouvelles mutations oncogéniques dans les cancers broncho-pulmonaires. La plupart des études publiées se sont focalisées sur les gènes encodant les protéines à activité kinase, qui représentent d'excellentes cibles thérapeutiques. Après une première étude conduite sur 26 échantillons de cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules ayant exploré 518 gènes encodant de telles protéines [51], le re-séquencage de 623 gènes impliqués dans la carcinogenèse a identifié 1013 mutations non synonymes dans 163 tumeurs, essentiellement à type de mutations ponctuelles (915 mutations) [36]. Outre les mutations oncogéniques (*driver mutations*), fréquentes et décrites précédemment [34] - les gènes de la voie de signalisation de l'EGFR étant les plus fréquemment touchés par les mutations (289 mutations) -, cette étude a mis en évidence des mutations récurrentes des gènes suivants: *HER4*, *CDKN2A*, *STK11*, *KDR*, *FGFR4*, *EPHA3*, *VEGFR*, *NTRK*, *NF1*, *APC*, et *RBI*. La signification oncogénique de ces mutations est inconnue. Enfin, de nombreuses mutations somatiques n'étaient retrouvées que dans des échantillons tumoraux uniques, et leur rôle dans la carcinogenèse est alors peu probable (*passenger mutations*). Plus récemment, le re-séquencage complet d'un adénocarcinome pulmonaire peu différencié d'un patient ancien fumeur a montré l'existence de plus de 50 000 variations ponctuelles de séquence, dont 530 mutations somatiques [52].

En pratique clinique, plusieurs techniques permettent la détection rapide et sensible de mutations oncogéniques connues. La technologie SEQUENOM est basée sur la mesure par spectrométrie de masse de la taille d'amplicons de PCR spécifiques intéressant la mutation recherchée [53]. La technique de séquençage SNAPSHOT repose sur une PCR multiplex avec la possibilité de détection par électrophorèse de 28 mutations dans 8 gènes de la voie de signalisation EGFR à partir d'ADN tumoral extrait de spécimens fixés et conservés en paraffine, avec une sensibilité 2 à 5 fois supérieure à celle du séquençage direct [54].

IV.1.2. Hybridation génomique comparative

Les techniques d'hybridation génomique comparative (CGH, pour *comparative genomic hybridization*) permettent la mise en évidence d'altérations du nombre de copies alléliques sur l'ensemble du génome, conduisant à l'établissement d'un profil génomique [55]. Dans une étude incluant 44 cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules, l'hybridation génomique comparative a permis l'identification de 93 variations focales du nombre de copies alléliques [56, 57]. De façon intéressante, ces variations étaient peu différentes en fonction de l'histologie tumorale, adénocarcinome ou carcinome épidermoïde. La mise à disposition de puces CGH à haute résolution (array CGH) permet d'identifier avec une plus haute précision des amplifications ou des micro-délétions survenant sur des gènes précis.

IV.1.3. Single Nucleotide Polymorphism arrays

Les puces *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) permettent l'analyse instantanée d'un grand nombre - compris entre 10 000 et 1000 000 selon les puces utilisées - de polymorphismes ponctuels de la séquence nucléotidique, appelés SNPs [58]. Les puces SNP contiennent jusqu'à 40 sondes différentes pour chaque SNP, permettant d'assurer une reproductibilité des résultats. Outre l'analyse de la séquence ADN, ces puces peuvent évaluer, à partir de la mesure de l'intensité du marquage fluorescent, les variations du nombre de copies alléliques sur l'ensemble du génome [59]. Ainsi, l'analyse par puce SNP de 371 adénocarcinomes broncho-pulmonaires a mis en évidence 57 variations récurrentes du nombre de copies alléliques, dont 31 anomalies étaient focales : 24 amplifications et 7 délétions alléliques [60]. Seules 6 de ces altérations survenaient sur des oncogènes connus. L'intégration des données avec celles du séquençage de gènes impliqués dans la carcinogenèse a montré des corrélations entre amplification et mutation oncogénique pour les oncogènes *EGFR*, *KRAS*, *MDM2* et *HER2*, et entre perte d'hétérozygotie et mutation pour les gènes suppresseurs de tumeur *CDKN2A*, *RBI*, *PTEN*, *TP53*, et *APC*. Une étude récente conduite sur 155 échantillons de carcinomes épidermoïdes broncho-pulmonaires a montré l'existence de 25 amplifications focales sur le génome tumoral [35]. L'amplification du gène *FGFR1* (*Fibroblast Growth Factor 1*), localisé dans la région 8p12, était identifiée et confirmée par hybridation fluorescente *in situ* (FISH) dans 10% à 22% des cas. Cette amplification, exclusivement retrouvée en cas de carcinome épidermoïde, a démontré son caractère oncogénique et était prédictive de l'efficacité d'un inhibiteur de la tyrosine kinase de FGFR, le PD173074, dans des cellules de lignée et des modèles xéno greffes [35].

Les puces SNP permettent enfin de réaliser des études d'association pan-génomique, visant à mettre en évidence des associations significatives entre des caractéristiques cliniques et des haplotypes définis par une combinaison d'allèles polymorphiques situés sur un locus spécifique. Le projet HapMap décrit les variations de polymorphismes observés dans les différents groupes ethniques, et constitue une base de référence pour ces analyses.

IV.1.4. Epigénomique

L'épigénomique correspond à l'étude des modifications de l'expression des gènes en l'absence de modification de leur séquence ADN, et induites par une méthylation de leurs promoteurs ou des modifications post-traductionnelles des protéines histones. Dans les cancers broncho-pulmonaires, une instabilité génomique liée à l'hypo-méthylation de régions géniques, de même qu'à l'hyper-méthylation aberrante de promoteurs de gènes suppresseurs de tumeur comme *P16INK4*, *RASSF1A*, ou *APC*, a été détectée dans des échantillons tumoraux, avec une valeur pronostique défavorable [61-64]. Ces altérations apparaissent précocement dans la carcinogenèse broncho-pulmonaire, en particulier chez le patient fumeur [62, 63]. Des puces spécifiques permettent d'évaluer la méthylation de régions alléliques sur l'ensemble du génome [65, 66].

IV.2. Analyse des altérations de l'ARN: transcriptomique

La transcriptomique correspond à l'étude de l'expression de l'ensemble des gènes dans un échantillon donné, et est rendue possible par le développement de puces d'expression qui permettent l'identification et la quantification relative des ARNm produits par un génome d'étude (par exemple issu de cellules tumorales) par rapport à un génome de référence (par exemple issu de cellules non-tumorales). L'ARN de l'échantillon tumoral et de l'échantillon non-tumoral est extrait et transcrit en ADN complémentaire, puis marqué par un fluorochrome et hybridé sur une puce spécifique.

De nombreuses études ont rapporté les résultats d'analyses des profils d'expression dans les adénocarcinomes broncho-pulmonaires. Les analyses non supervisées de ces profils mettent en évidence, de façon assez reproductible entre les différents panels d'échantillons étudiés, l'existence de 3 groupes spécifiques sur le plan histo-pathologique et moléculaire [67-73]: un premier cluster, de meilleur pronostic et constitué de tumeurs avec une architecture prédominante papillaire ou micro-papillaire, associé à la présence de mutations de l'*EGFR*; un second groupe correspondant aux carcinomes avec composante lépidique prédominante (bronchiolo-alvéolaire); et un troisième groupe de tumeurs de patients fumeurs, avec une morphologie solide et au pronostic plus défavorable. Les clusters 1 et 2 correspondent aux adénocarcinomes développés aux dépens de l'unité respiratoire terminale [69, 74]. Le cluster 3 est associé aux mutations de *TP53* et de *KRAS*. Ces constatations ont été utilisées pour valider le concept de sous-type morphologique prédominant et de semi-quantification en routine des sous-types histo-pathologiques d'adénocarcinome [5, 67]. Les analyses supervisées ont permis de définir des signatures d'expression génique associées à un pronostic favorable ou défavorable [75, 76]. L'intégration de ces données avec celles des profils génomiques est possible [77].

Plus récemment, l'étude des micro-ARNs est rendue possible par le développement de puces spécifiques. Les micro-ARN sont des fragments d'ARN non codant de taille comprise entre 18 et 24 nucléotides, et qui régulent de façon négative l'expression génique en se fixant sur les ARNm [78]. Contrairement aux ARNm, leur extraction est aisée dans des échantillons tumoraux non congelés, le sang ou les expectorations. Les profils micro-ARN sont aujourd'hui essentiellement utilisés pour identifier des marqueurs diagnostiques - par exemple les *hsa-mir-205*, *hsa-mir-99b*, *hsa-mir-203*, *hsa-mir-202*, et *hsa-mir-102* associés au type histologique adénocarcinomateux - ou pronostiques - *hsa-mir-155* et *hsa-let-7a-2* associés à une survie plus courte [78, 79]. Ces données précoces doivent faire l'objet de standardisation des techniques de mesure et d'analyse, et de validation externe.

IV.3. Analyse des altérations des protéines: protéomique

La génomique et la transcriptomique ne permettent pas toujours de prédire le phénotype protéique d'une cellule déterminée. La corrélation entre le niveau d'expression d'un ARNm et le niveau d'expression de la protéine encodée est faible, du fait de l'existence de mécanismes épigénétiques d'une part et de modifications post-traductionnelles des protéines d'autre part.

De nombreuses méthodes permettent d'établir des profils protéiques: électrophorèses en 2 dimensions et spectrométrie de masse, MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry*), LC-MS (*liquid chromatography tandem mass spectrometry*), *Receptor Tyrosine Kinase arrays* - qui permettent de détecter la phosphorylation de multiples kinases en un temps - [80]. Les *tissue micro-arrays* permettent d'analyser en immunohistochimie ou pour détection *in situ* d'ADN, plusieurs dizaines d'échantillons tumoraux en un temps, étant constitués d'un assemblage de biopsies cylindriques issues de blocs de paraffine de tumeurs individuelles colligées au sein d'un même bloc [81]. Dans les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules, une étude a analysé les profils de phosphorylation de kinases par LC-MS dans 150 tumeurs individuelles, et a mis en évidence l'activation de multiples kinases dont EGFR, PDGFR, DDR1, ROS et ALK [82].

Au total, les nouvelles méthodes d'analyse moléculaire permettent une caractérisation complète, intégrative, des altérations survenant sur l'ADN, l'ARN, et les protéines au sein des cellules tumorales. Les données collectées dans les cancers broncho-pulmonaires constituent

une base de référence pour les études moléculaires futures. Au sein des multiples anomalies mises en évidence, de nouvelles mutations oncogéniques peuvent être identifiées, qui définissent de nouveaux sous-groupes moléculaires spécifiques. Les projets conduits dans le cadre de ce travail illustrent l'utilisation de ces outils pour la résolution de problématiques cliniques spécifiques.

SECONDE PARTIE

Prédisposition génétique au cancer broncho-pulmonaire chez le patient non-fumeur

I. Problématique du cancer broncho-pulmonaire chez le non-fumeur

Le tabagisme est la principale cause des cancers broncho-pulmonaires [83], mais une proportion croissante de ces tumeurs est diagnostiquée chez des patients non-fumeurs, c'est-à-dire des individus ayant consommé moins de 100 cigarettes au cours de leur existence [84].

I.1. Fréquence des cancers broncho-pulmonaires chez le non-fumeur

Aux Etats-Unis, plus de 10% des patients atteints de cancer broncho-pulmonaire sont des non-fumeurs, ce qui représente un total d'environ 21500 patients par an. Le taux d'incidence annuel du cancer broncho-pulmonaire ajusté à l'âge est compris entre 4,8 et 20,8 pour 100 000 individus non-fumeurs selon les séries [84, 85]. La proportion de non-fumeurs parmi les patients atteints de cancer broncho-pulmonaire est encore plus élevée en Asie du Sud-Est, atteignant près d'un tiers des cas dans une cohorte de 883 patients traités à Singapour [85].

I.2. Caractéristiques cliniques du cancer broncho-pulmonaire chez le non-fumeur

Chez les patients non-fumeurs, le sous-type de cancer broncho-pulmonaire le plus fréquent est l'adénocarcinome [86, 87], qui représente entre 67% et 76% des cas [88] ; 60% à 70% de ces patients sont des femmes [85, 89-91]. Ces données sont similaires aux Etats-Unis et en Asie, mais la prévalence du tabagisme chez les femmes asiatiques est plus faible [92, 93]. Réciproquement, 20% des femmes atteintes de cancer broncho-pulmonaire n'ont jamais fumé, alors que seuls 10% des hommes atteints de cancer broncho-pulmonaire sont des non-fumeurs [94]. Ces données n'indiquent d'ailleurs pas obligatoirement un risque plus élevé de cancer broncho-pulmonaire chez les femmes non-fumeuses, puisque plus de femmes sont non-fumeuses, et que les femmes vivent plus longtemps que les hommes [95]. En Europe, la prévalence du tabagisme reste plus élevée, et la proportion de non-fumeurs parmi les patients atteints de cancer broncho-pulmonaire est plus faible.

La survie globale des patients non-fumeurs porteurs de cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules métastatique est significativement supérieure à celle des patients fumeurs, quel que soit le traitement anti-tumoral administré [87, 96]. Du fait de la fréquence accrue de tumeurs porteuses de mutations activatrices de l'*EGFR*, la réponse et la survie des patients non-fumeurs traités par gefitinib ou erlotinib sont supérieures à celles observées chez les fumeurs [20, 31, 97].

I.3. Causes du cancer broncho-pulmonaire chez le non-fumeur

Les causes du cancer bronchique chez le non-fumeur ne sont pas élucidées. Près de 30% des cas semblent liés à une exposition au tabagisme passif [88, 98], et près de 25% des cas à une exposition domestique au radon [99, 100]. On estime que 4% des cas sont associés à des expositions professionnelles, et 2% des cas à des polluants atmosphériques [101]. Ces données sont difficiles d'interprétation, la plupart des études étant rétrospectives et incluant des patients par ailleurs fumeurs. Au total, près de 40% des cancers broncho-pulmonaires du non-fumeur restent « inexplicables ». Diverses hypothèses ont été émises: inhalation d'huiles de cuisson [102], de vapeurs de charbon [103], d'amiante, d'arsenic, de métaux lourds (chrome, nickel, fer), ou de suies. Certains ont suggéré l'influence de facteurs alimentaires [104], d'antécédents de maladie pulmonaire inflammatoire [105] ou d'infection virale, notamment par le *Human PapillomaVirus 16/18* [106] ou le *Jaasiekte sheep retrovirus* [107].

I.4. Mutations oncogéniques des cancers broncho-pulmonaires chez le non-fumeur

Parmi les altérations oncogéniques identifiées dans les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules, les mutations *EGFR* et *HER2* sont les plus associées à l'absence de tabagisme [5, 24, 108, 109]. Bien que les mutations de *KRAS* soient classiquement associées au tabagisme, certaines mutations (G12A, G12D) surviennent plus spécifiquement dans des tumeurs développées chez des non-fumeurs [110]. De même pour *TP53*, certaines mutations identifiées dans le tissu tumoral sont associées au phénotype non-fumeur [111].

I.5. Prédilection génétique au cancer broncho-pulmonaire

I.5.1. Données historiques

L'existence d'une susceptibilité génétique au cancer broncho-pulmonaire a initialement été identifiée dans les séries de cas familiaux de cancer broncho-pulmonaire [112-114]. Une méta-analyse récente a inclus 28 études cas-témoin et 4 études de cohorte posant la question du risque familial de cancer broncho-pulmonaire, et a conclu à un doublement du risque en cas d'antécédent familial de cancer broncho-pulmonaire, et ce quelque soit l'histoire tabagique personnelle [115]. Les gènes liés à cette prédilection familiale ne sont pas connus.

De nombreuses études se sont par ailleurs intéressées aux polymorphismes génétiques associés au cancer broncho-pulmonaire. Les SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) correspondent à des variations de nucléotide ponctuelles et isolées, et révèlent un polymorphisme entre deux ou plusieurs séquences d'ADN. Ces variations sont germinales et sont ainsi identifiables dans toutes les cellules de l'organisme. Les SNPs sont retrouvés toutes les 100 à 300 bases sur le génome. La plupart des SNPs sont localisés dans des régions non codantes, et sont sans conséquences fonctionnelles. En revanche, dans le cas où un SNP touche une région codante ou une région régulatrice, les séquences géniques et protéiques peuvent être modifiées. Les SNPs peuvent ainsi cartographier des maladies multifactorielles par une identification de gènes candidats [116]. La puissance des marqueurs SNPs vient essentiellement de leur fréquence et de leur présence sur l'ensemble du génome. Chaque profil de SNPs est propre à un individu donné.

Dans les cancers broncho-pulmonaires, les polymorphismes les plus étudiés ont été ceux des gènes impliqués dans le métabolisme des carcinogènes dérivés du tabac: *ATM* [117], *CYP1A1* [118-120], *ERCC2* [121], *GSTM1* [122], *MDM2* [123], *MPO* [124], *NQO1* [124], ou *XRCC1* [125, 126]. Plus récemment, la possibilité de cartographier plusieurs milliers de SNPs à l'aide de puces spécifiques, et la mise à disposition de centres de génotypage assurant une gestion rigoureuse de la qualité des données, permettent la caractérisation plus complète des profils SNPs [127].

I.5.2. Etudes d'association pan-génomique

En comparant les SNPs des individus porteurs d'une maladie à ceux de contrôles sains par l'utilisation de SNP arrays, une méthodologie appelée « Etude d'association pan-génomique » (*Genome-wide association study*), il est en effet possible d'identifier des régions génomiques spécifiquement associées à la maladie, sans hypothèse *a priori* sur un gène ou une voie de signalisation précise. Trois études de ce type ont été publiées simultanément en 2008 dans les cancers broncho-pulmonaires [128-130]. La première étude, européenne, a comparé la fréquence de 315 450 SNPs chez 1989 patients atteints de cancer bronchique et 2625 témoins. Les résultats ont identifié une augmentation significative du risque de cancer

broncho-pulmonaire d'un facteur 1,80 chez les individus porteurs homozygotes d'une variation mineure du SNP rs1051730 (RR: 1,8 ; IC95%: 1,49-2,18 ; $p=5 \times 10^{-9}$) [128]. Le risque relatif pour les patients homozygotes pour les variations mineures d'un autre SNP, rs8034291, était également de 1,80 (IC95%: 1,49-2,18 ; $p=9 \times 10^{-10}$). Ces deux SNPs sont localisés dans le locus 15q24-25. Cette région encode plusieurs gènes de la famille des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (*CHRNA5*, *CHRNA3* et *CHRNA4*). Ces récepteurs sont connus comme des acteurs de la dépendance au tabac [131]. Une seconde étude, américaine, a suivi la même méthodologie chez 1154 patients et 1137 témoins, et a identifié les mêmes SNPs comme étant associés à risque accru de cancer broncho-pulmonaire [129]. La troisième étude, publiée par l'institut islandais *DeCode*, a inclus 10 995 individus, et avait pour objectif initial l'identification des gènes liés à la dépendance au tabac [130]. Les patients étaient comparés en fonction du niveau de leur consommation quotidienne de tabac. De façon intéressante, cette étude a montré que le polymorphisme rs1051730 était significativement associé à la dépendance au tabac ($p=5 \times 10^{-16}$), et confirmait l'association au risque de cancer broncho-pulmonaire dans un échantillon de 1024 cas de cancer et de 32 244 contrôles (RR: 1.31 ; IC95%: 1,19-1,44 ; $p=1,5 \times 10^{-8}$). Les analyses secondaires réalisées sur la cohorte américaine ont confirmé l'association entre le SNP rs1051730 et le risque de broncho-pneumopathie chronique obstructive, d'emphysème et de cancer, via la dépendance au tabac [132, 133]. Une étude hawaïenne a montré l'association entre les allèles mineurs de ce SNP et les taux de cotinine et de dérivés nitrosamines urinaires, témoins de la consommation de tabac [134]. Une méta-analyse de l'Université Washington a inclus 38 617 fumeurs, 7700 patients atteints de cancer broncho-pulmonaire, 5914 contrôles fumeurs indemnes de cancer, et 3568 contrôles fumeurs indemnes de broncho-pneumopathie chronique obstructive. Les SNPs rs16969968 et rs588765, situés dans le locus 15q25.1, étaient significativement et indépendamment associés à la broncho-pneumopathie chronique obstructive et au risque de cancer broncho-pulmonaire [135].

Au total, ces études ont identifié l'existence d'une prédisposition génétique au cancer broncho-pulmonaire, médiée par la dépendance et la consommation tabagique. Les gènes identifiés encodent les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine. Les analyses en sous-groupes conduites dans ces études n'ont cependant pas permis de montrer de différence de risque significative entre fumeurs et non-fumeurs.

I.5.3. Prédiposition génétique au cancer broncho-pulmonaire chez le non-fumeur

En 2009, seules quelques études rapportant les résultats d'étude d'association pangénomique conduites spécifiquement chez des individus non-fumeurs atteints ou non de cancer broncho-pulmonaire étaient disponibles. La principale série était taïwanaise, et compte-tenu de la fréquence élevée des mutations somatiques de l'*EGFR* dans les cancers broncho-pulmonaires chez les patients asiatiques, s'est focalisée sur 14 SNPs localisés sur ce gène, étudiées dans une cohorte de 730 patients appariés à 730 contrôles [136]. Le SNP rs763317 (mutation G>A) dans l'intron 1 du gène était significativement associé à un risque accru de cancer broncho-pulmonaire (état hétérozygote: RR: 1,16 ; IC95%:0,93-1,44 ; $p=0,009$; état homozygote: RR: 2,40; IC95%:1,34-4,33 ; $p=0,008$). Chez les femmes non-fumeuses atteintes d'adénocarcinome, l'association était encore plus forte (état hétérozygote: RR: 1,23 ; IC95%:0,87-1,75; état homozygote: RR: 3,52 ; IC95%:1,32-9,37). La significativité de ces associations restait toutefois limitée du fait du nombre relativement faible de patients inclus, et restait sous le seuil de 10^{-7} habituellement utilisé pour ce type d'étude.

Une autre cause rare de susceptibilité génétique au cancer broncho-pulmonaire, en particulier chez le non-fumeur, est la présence d'une mutation germinale T790M de l'*EGFR*

[137-139]. Identifiée initialement dans une famille dans laquelle 6 individus sur 3 générations ont présenté un cancer broncho-pulmonaire, dans 3 cas de type bronchiolo-alvéolaire [137], cette mutation a été depuis rapportée dans 2 autres familles [139].

En conclusion, les patients non-fumeurs atteints de cancer broncho-pulmonaire représentent un groupe spécifique et homogène, différent de celui des patients fumeurs à la fois du fait d'une proportion élevée de femmes et d'adénocarcinomes, d'une survie supérieure, et, comme nous l'avons discuté précédemment, de l'existence de mutations activatrices de l'*EGFR* prédictives de la réponse aux TKIs. La part des facteurs génétiques dans la survenue de ces tumeurs est vraisemblablement importante, et la mise en évidence de variants géniques, outre identifier des individus à risque pour des campagnes de prévention et de dépistage, pourrait permettre la découverte de nouveaux marqueurs diagnostiques et de cibles thérapeutiques potentielles.

II. Travail de recherche: étude des gènes de prédisposition au cancer broncho-pulmonaire chez le non-fumeur

Les objectifs de notre projet étaient: 1) de collecter des informations cliniques et des échantillons biologiques sur une cohorte de 2000 patients non-fumeurs atteints de cancer broncho-pulmonaire, 2) de réaliser une étude d'association pan-génomique pour identifier les gènes prédisposant à l'adénocarcinome pulmonaire chez les femmes caucasiennes non-fumeuses, c'est-à-dire dans le sous-groupe de patients non-fumeurs le plus fréquent dans la population américaine, et 3) de comparer nos résultats à ceux obtenus dans deux cohortes de patientes asiatiques.

Nous avons mis en place un protocole prospectif national de recrutement de patients non-fumeurs atteints de cancer broncho-pulmonaire. Compte tenu de la nécessité d'une collecte rapide d'échantillons biologiques (sang ou salive) pour l'étude d'association pan-génomique, nous avons conçu un site Internet (www.mskcc.org/neversmokerswithlungcancer) permettant d'informer et de recruter les patients volontaires, qui pouvaient nous contacter par le biais du site pour déposer leurs coordonnées (**Figure 5**).

Ce protocole de recherche clinique non interventionnelle a été approuvé par l'Institutional Review Board du *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* (MSKCC ; protocole MSKCC IRB#08104), et enregistré dans la base www.clinicaltrials.gov (NCT00745160). Lors du déménagement du laboratoire de W. Pao au *Vanderbilt-Ingram Cancer Center* à Nashville, nous avons transféré le protocole et le site internet (www.vicc/neversmokerswithlungcancer ; VICC IRB# 090568; NCT01141218). Le délai de mise en place administrative de ce protocole a été de 4 mois. L'étude a été ouverte officiellement le 24 septembre 2008. En termes de calendrier, nous estimions que le recrutement des 2000 patients serait obtenu en 24 mois. La difficulté principale était de faire connaître l'étude auprès des associations de patients et des praticiens les prenant en charge.

Le recrutement dans le protocole a été plus faible que prévu. Après 12 mois, seuls 201 patients avaient renvoyé des échantillons sanguins via l'utilisation du site internet. L'analyse publiée a été réalisée après inclusion des 124 premiers patients.

Figure 5: Site Internet www.mskcc.org/neversmokerswithlungcancer: page d'accueil

Survey and blood sample collection for patients with lung cancer who never smoked cigarettes
[Protocol 08-104]

Full Title :
MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER SURVEY AND BLOOD SAMPLE COLLECTION FOR PATIENTS WITH LUNG CANCER WHO NEVER SMOKED CIGARETTES

Purpose :
Lung cancer is the leading cause of cancer-related death in the US and worldwide. Most patients who develop lung cancer have a history of smoking cigarettes. However, about 1 in 10 lung cancer patients has no history of direct tobacco exposure. A majority of these patients are women and have a subtype of lung cancer with adenocarcinoma histology. We think that these 'never smokers' may have genes that predispose them to lung cancer. No such genes have yet been identified.

The purpose of this study is to determine if collecting information and blood from a group of people who never smoked but who have lung cancer, is possible across the US.

We will collect information on each patient's diagnosis and treatments. If the collection is successful, blood samples will be used for so-called 'whole genome association studies' to look for differences between the genomes of never smokers with and without lung cancer. This may help to identify new genes, which may explain and predict why certain patients develop lung cancer without having smoked tobacco. This is the first step to establish strategies to prevent lung cancer or find people who are at high risk for this disease.

Eligibility :
To be eligible for this study, patients must meet several criteria, including but not limited to the following: being above age 18, having non-small cell lung cancer, and being a never smoker, defined as having smoked less than 100 cigarettes over the entire life-time.

We encourage you to participate in our research study. It involves filling out a short questionnaire and giving a blood sample. You can have these tubes of blood drawn when you have routine blood tests performed at your doctor's office, or at a local laboratory testing provider. There are no costs involved in participating in the study.

For more information and to see if you are eligible for this study, please use our [online form](#) to contact us.
If you would prefer to talk to someone, please contact Dr. [William Pao](#), Principal Investigator, at 1-866-854-4652. You can also contact us by e-mail at neversmokerswithlungcancer@mskcc.org.

Survey and blood sample collection for patients with lung cancer who never smoked cigarettes
[Protocol 08-104]

Thank you for your interest in Memorial Sloan-Kettering Cancer Center's Survey and blood sample collection for patients with lung cancer who never smoked cigarettes.

Your participation is valuable to help us learn more about lung cancer in never smokers. If you would like to receive information regarding the details of the study, please fill in the information below.

If you have any questions or concerns, you may contact [Dr. William Pao](#), Principal Investigator, at 1-866-854-4652. You can also contact us by e-mail at neversmokerswithlungcancer@mskcc.org.

*** indicates required information**

* Last Name:

* First Name:

* E-mail Address:

* Confirm E-Mail:

* Address Line 1:

Address Line 2:

* City:

* State:

* ZIP Code:

Please enter the phone numbers at which you would prefer to be reached from 9:00 AM - 5:00 PM, eastern time.

* Phone:

Home Work Cell

Alternate Phone:

Home Work Cell

* Preferred initial contact method:

Email (You will need to have a printer)
 Mail
 Phone

Pour conduire notre étude d'association pan-génomique, nous avons donc, en parallèle du protocole prospectif, collecté au sein de l'institution des échantillons sanguins de 120 patientes non-fumeuses atteintes de cancer broncho-pulmonaire. Nous disposions également d'échantillons sanguins de femmes contrôles caucasiennes, non-fumeuses, indemnes de cancer, et appariées pour l'âge (n=95). Nous avons enfin analysé une cohorte de cas et de contrôles issus de l'*Aichi Cancer Center* de Nagoya au Japon. Ces cas (n=125) et ces contrôles (n=247) étaient également appariés. Notre étude a été approuvée par l'Institutional Review Board et le Privacy Board du *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* (HBUC Numbers: HBS2008082 et HBS2009015; IRB Waiver Numbers: WA0385-08 et WA0129-09).

Nous avons utilisé une plateforme Illumina, avec des puces Human610Quad SNP, ciblant plus de 600 000 SNPs communs aux populations caucasiennes et asiatiques. Le centre de génomique de l'institution nous a offert, outre l'accès à cette plateforme, une formation initiale et une aide technique pour l'hybridation des puces. L'analyse des données a été réalisée par le Dr. Robert Klein [140]. L'estimation initiale était qu'avec 400 patients dans le groupe de cas et le groupe contrôle, l'étude aurait une puissance de 80% pour détecter une augmentation du risque relatif de cancer de 2,2, et une puissance de 50% pour détecter une augmentation du risque relatif de 1,9.

Outre les SNPs inclus sur la plateforme Illumina, nous avons exploré les 2 SNPs du gène de l'*EGFR* précédemment identifiés dans la littérature comme étant associés à un risque accru de cancer broncho-pulmonaire: la mutation T790M dans l'exon 20 et le SNP rs763317 dans l'intron 1. Nous avons procédé par séquençage direct.

Les résultats préliminaires de ce travail sont décrits en détail dans le manuscrit, page suivante: **N. Girard, E. Lou, CG. Azzoli, R. Reddy, M. Robson, M. Harlan, I. Orlow, Y. Yatabe, K. Nafa, M. Ladanyi, A. Viale, MG. Kris, G. Riely, V. Miller, RJ. Klein, K. Matsuo, W. Pao. Analysis of genetic variants in never-smokers with lung cancer facilitated by an Internet-based blood collection protocol: a preliminary report. Clin Cancer Res 2010;16:755-63**

En bref, les résultats préliminaires de cette étude sont les suivants: (1) Nous avons identifié 2 nouveaux cas de mutation germinale T790M de l'*EGFR*; ces 2 mutations étaient retrouvées exclusivement chez des patients atteints de cancer broncho-pulmonaire. Dans notre cohorte de large effectif (n=369), la fréquence de ce polymorphisme était donc de 0,54%. Aucune mutation T790M n'a été retrouvée chez les 292 contrôles appariés pour l'âge et le sexe ($p=0.208$). (2) Nous n'avons pas retrouvé l'association entre l'allèle mineur du SNP rs763317 de l'*EGFR* et un risque accru de cancer broncho-pulmonaire, chez les 369 cas et les 292 contrôles testés, et ce malgré une puissance *a priori* suffisante. (3) Nous n'avons pas identifié de SNP associé à un risque significativement accru de cancer broncho-pulmonaire dans le groupe anatomo-clinique le plus important de notre cohorte, à savoir les 217 patientes non-fumeuses atteintes d'adénocarcinome pulmonaire appariées pour l'âge et le sexe aux 342 contrôles. En particulier, aucun des polymorphismes du *CHRNA3*, rs8034191 ou rs1051730, n'était significativement plus fréquent dans notre population de cas, par rapport à la population contrôle. Cette constatation peut cependant être due à un manque de puissance statistique.

Ces données préliminaires indiquent toutefois la faisabilité de notre approche pour collecter des échantillons sanguins de patients non-fumeurs atteints de cancer broncho-pulmonaire. Le déménagement du laboratoire du Dr Pao à la Vanderbilt University de Nashville a probablement été un facteur limitant important pour le recrutement initial de cette étude. Le protocole a été ré-ouvert dans cette institution, et des efforts supplémentaires d'information des patients et des praticiens ont été conduits.

Nos résultats montrent également la faisabilité des études d'association pan-génomique chez les patients non-fumeurs atteints de cancer broncho-pulmonaire. L'objectif principal d'identification de variants associés à un risque de cancer n'a pas été atteint à ce stade de l'étude. L'absence de reproduction de l'association identifiée pour le SNP *EGFR* rs763317 montre la nécessité de validation de tous les résultats publiés dans ce domaine. Nos données suggèrent le rôle crucial de l'ethnie et du tabagisme dans la variation du risque, les polymorphismes précédemment identifiés chez les asiatiques et les fumeurs n'apparaissant pas comme étant significatifs dans notre cohorte.

III. Perspectives: données récentes sur la prédisposition génétique au cancer broncho-pulmonaire chez le non-fumeur

Depuis la publication de notre travail, plusieurs études et ré-analyses de données existantes ont identifié l'existence de nouveaux variants SNPs associé au cancer broncho-pulmonaire, en particulier chez les individus non-fumeurs.

Une analyse poolée des données de 21 études d'association génomique incluant un total de 11 645 patients atteints de cancer broncho-pulmonaire et 14 594 contrôles, en majorité caucasiens (85% des cas), a été rapportée [141]. Cette étude a validé les variants de la région 15q25, en particulier le SNP rs16969968 (RR: 1,26 ; IC95%:1,21-1,32 ; $p=2 \times 10^{-26}$), comme étant associés à un risque significatif de cancer broncho-pulmonaire, mais ne retrouvait pas d'association significative entre ce variant et le risque de cancer dans les sous-groupes de patients asiatiques ou non-fumeurs. L'analyse détaillée de ce SNP rs16969968, non présent sur le panel de la puce Illumina, a montré une association avec le risque de cancer broncho-pulmonaire, indépendante de la quantité de tabac consommée chez les fumeurs actifs ou les anciens fumeurs [142]. Chez les non-fumeurs, l'association n'était cependant pas significative (RR=1,18 ; IC95%: 0,99-1,40 ; $p=0,07$).

L'ethnie apparaît cruciale dans l'informativité des SNPs sur le risque de cancer conféré par une région chromosomique, puisque la proportion de chaque polymorphisme est variable dans les populations caucasiennes et asiatiques. Ainsi la région 15q25 apparaît-elle également associée à un risque accru de dépendance au tabac et de cancer broncho-pulmonaire dans la population chinoise, mais les SNPs spécifiques de cette région identifiés chez les caucasiens ne l'étaient pas dans cette population [143]. L'association était mise en évidence sur l'étude de SNPs plus informatifs dans cette population (rs2036534, rs667282, rs12910984, et rs6495309) [143].

L'analyse poolée de 21 études d'association génomique a également confirmé l'association entre risque de cancer broncho-pulmonaire et les variants mineurs des SNP rs2736100 (RR: 1,15 ; IC95%: 1,10-1,20 ; $p=1 \times 10^{-10}$) et rs402710 (RR: 1,14 ; IC95%: 1,09-1,19 ; $p=5 \times 10^{-8}$) de la région 5p15, contenant le gène de la *telomerase reverse transcriptase* (TERT) dans les populations caucasiennes et asiatiques. Cette association avait été suggérée par l'étude européenne [141, 144]. Le SNP rs2736100 est situé dans l'intron 1 du gène *TERT*, activé dans les cancers et responsable d'un potentiel de répllication cellulaire illimitée. Le SNP rs402710 est situé dans une région contenant le promoteur de *TERT* et le gène *CLPTMIL*. Ces associations étaient différentes en fonction de l'histologie tumorale, le SNP rs2736100 étant plus spécifiquement associé aux adénocarcinomes [141]. Une autre étude du consortium international a confirmé ce résultat. Incluant 13 300 patients caucasiens atteints de cancer broncho-pulmonaire et 19 666 contrôles, cette analyse a étudié les associations entre les polymorphismes précédemment identifiés et le cancer broncho-pulmonaire, en fonction du type histologique de la tumeur [145]. Le SNP rs2736100 (*TERT*) était associé à un risque accru et spécifique d'adénocarcinome pulmonaire (RR:1,23; IC95%:1,13-1,33; $p=3,02 \times 10^{-7}$). L'association avec les tumeurs d'histologie non adénocarcinomateuse n'était pas significative, et ce également dans les cohortes de validation étudiées. Cette spécificité histologique n'était pas retrouvée pour les SNPs de la région 15q25 [141].

Le SNP rs2736100 (*TERT*) a enfin été identifié comme étant associé au cancer broncho-pulmonaire chez les femmes non-fumeuses dans plusieurs séries. Dans la série taïwanaise de 584 patientes et 585 contrôles, validée par une cohorte de 1164 cas et 1736 contrôles, ce SNP était significativement associé au cancer broncho-pulmonaire (RR: 1,54 ; IC95% 1,41-1,68 ;

$p=2,6 \times 10^{-20}$) [146]. Des résultats similaires étaient retrouvés dans une série japonaise et dans le groupe des adénocarcinomes de la série anglaise GELCAPS [147, 148].

Nous n'avons pas retrouvé d'association entre le locus 5p15 et le risque de cancer dans notre cohorte de patients non-fumeurs, possiblement du fait du faible nombre de patientes asiatiques atteintes de cancer broncho-pulmonaire, du déséquilibre entre nos populations de contrôles, en majorité asiatiques, et de cas, en majorité caucasiens. Cette association pourrait être spécifiquement retrouvée dans les populations asiatiques.

L'intégration des données génomiques avec une caractérisation clinique plus détaillée des patients inclus dans ces analyses est cruciale dans l'évaluation des résultats. Ainsi, une étude conduite à Singapour a étudié 6 polymorphismes répartis sur 5 gènes de l'inflammation - *IL1-β*, *IL6*, *COX-2*, *PPAR-γ* et *IL1RN* -, dans des sous-groupes de patientes non-fumeuses porteuses de diverses maladies inflammatoires pulmonaires - tuberculose, asthme, toux chronique, atopie - et atteintes (n=433) ou non (n=1375) de cancer broncho-pulmonaire [149]. Dans cette étude, le risque de cancer broncho-pulmonaire était augmenté chez les patientes atteintes de l'une ou l'autre de ces maladies inflammatoires et porteuses de certains polymorphismes à l'état homozygote: par exemple, la présence de l'allèle mineur T/T du SNP rs1143627 du gène *IL1-β* augmentait le risque de cancer uniquement pour le groupe de patientes atteintes d'asthme ou de toux chronique (RR: 2,24 ; IC95%: 1,15-4,38 ; $p=0,018$). Les SNPs testés dans cette étude sont inclus dans la puce Illumina que nous avons utilisée, mais aucun d'entre eux n'apparaissait lié - même avec un risque relatif plus faible que le seuil fixé dans notre analyse - à un risque accru de cancer broncho-pulmonaire. Nous ne disposons pas de données cliniques sur d'éventuelles co-morbidités inflammatoires pour la plupart des patients inclus dans notre cohorte.

De nombreuses publications rapportent les résultats d'analyses statistiques conduites sur les données d'une ou de plusieurs cohortes. Chaque semaine, de nouveaux polymorphismes de susceptibilité au cancer broncho-pulmonaire sont identifiés, par exemple dans les gènes contrôlant l'apoptose comme *TNFSF8* [150] ou les gènes de réparation de l'ADN comme *TP53*, *ATM*, ou *ERCC1* [148, 151, 152]. D'autres études ont été publiées chez les non-fumeurs. Le variant rs2352028 sur le gène glypican 5 (*GPC5*) sur le locus13q31.3 a été associé de façon significative au cancer broncho-pulmonaire dans cette population (RR: 1.46 ; IC95%:1,26-1,70 ; $p=5,94 \times 10^{-6}$) [153]. Le *GPC5* est impliqué dans la division cellulaire et la régulation de la croissance tumorale, et la présence de ces variants mineurs conduit à une réduction de son expression dans le tissu pulmonaire normal.

Tous ces résultats doivent être validés dans des cohortes indépendantes, en particulier chez le non-fumeur et dans des sous-groupes histologiques et ethniques spécifiques. L'utilisation de seuils de significativité suffisants (10^{-7} au minimum) et la sélection d'associations augmentant le risque relatif de cancer d'un facteur supérieur à 2 sont les garants d'une meilleure reproductibilité et d'une potentielle pertinence biologique et clinique. Des études biologiques doivent être conduites afin de comprendre les mécanismes moléculaires et le rôle de ces différents gènes de susceptibilité. La significativité clinique de ces polymorphismes doit être évaluée dans le cadre d'études prospectives, par exemple de dépistage du cancer broncho-pulmonaire.

TROISIÈME PARTIE

Hétérogénéité inter- et intra-tumorale des cancers broncho-pulmonaires

I. Problématique de l'hétérogénéité intra- et inter-tumorale des cancers broncho-pulmonaires

I.1. Hétérogénéité intra-tumorale des cancers broncho-pulmonaires

Au-delà du typage histologique distinguant adénocarcinomes, carcinomes épidermoïdes, et carcinomes indifférenciés à grandes cellules, les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules sont des tumeurs hétérogènes. Ainsi, comme nous l'avons détaillé précédemment, les adénocarcinomes regroupent des tumeurs d'architectures diverses - sous-types acinaire, à croissance lépidique/bronchiolo-alvéolaire, solide, et papillaire [5, 67]. Les profils d'expression de ces différentes entités morphologiques sont différents [67, 71-75], et plusieurs études de faible effectif ont suggéré des corrélations entre composante morphologique prédominante et statut mutationnel oncogénique: ainsi les sous-types bronchiolo-alvéolaires et papillaires ont été associés à la présence de mutations activatrices de l'*EGFR* [5, 67, 154], le sous-type solide aux mutations de *KRAS* [67], et le variant cellulaire en bague à chaton aux translocations *EML4-ALK* [155]. Le sous-type histologique prédominant n'a cependant pas été systématiquement intégré dans l'analyse des études de profilage génomique et mutationnel de plus large effectif [36, 60]. Au plan clinique, les tumeurs broncho-pulmonaires avec une composante adénocarcinomeuse à croissance lépidique, prédominante ou non, seraient de meilleur pronostic, indépendamment du statut mutationnel ou des traitements reçus [156-158], et les tumeurs de morphologie micro-papillaire prédominante de pronostic plus défavorable [159]. A noter que pour les carcinomes épidermoïdes, si des variants - basaloïdes, papillaire ou à cellules claires - ont été décrits [5, 160], aucune donnée sur l'hétérogénéité tumorale n'a été rapportée à ce jour. L'absence de caractérisation moléculaire intégrative disponible pour ces tumeurs ne permet pas d'identifier de sous-groupes moléculaires spécifiques.

L'interprétation de ces données est complexe si l'on intègre la quantification systématique de chaque sous-type morphologique présent dans les tumeurs individuelles. Cette hétérogénéité morphologique reflète-t-elle l'existence de différents clones tumoraux? Quelle est la reproductibilité des profils génomiques, mutationnels, ou d'expression dans différentes zones d'une même tumeur? Quel est le niveau de corrélation entre statut mutationnel oncogénique et sous-types histologiques en présence? Comment évaluer le pronostic en fonction des sous-types histologiques de la tumeur?

Seule une étude a analysé de façon systématique l'hétérogénéité moléculaire des cancers broncho-pulmonaires [161]. Cette série japonaise a inclus 21 patients atteints d'adénocarcinome porteurs d'une mutation activatrice de l'*EGFR* et a consisté en la recherche de ces mutations par technique PCR (SNAPSHOT) dans 50 à 60 biopsies de 100 μm^2 réalisées par microdissection laser dans différentes zones de la tumeur. Les résultats ont montré une homogénéité moléculaire pour 15 tumeurs, pour lesquelles la mutation était identifiée dans toutes les biopsies réalisées. Pour les 6 tumeurs restantes, la mutation n'était retrouvée que dans une partie des zones tumorales analysées (de 0 à 84% des biopsies). Cette étude a été conduite sur fragments tumoraux congelés. Le mode de conservation du tissu peut interférer dans ce type d'analyse, une étude antérieure ayant montré l'existence de faux-négatifs (20% des cas) de la recherche de mutations *EGFR* réalisée sur fragments fixés et inclus en paraffine, par rapport à la recherche réalisée sur tissu congelé [162]. La sensibilité de la technique de recherche de mutation joue également un rôle dans l'interprétation des résultats. Comme nous l'avons vu précédemment, des clones cellulaires porteurs de la mutation T790M peuvent être identifiés par des techniques de PCR ultra-sensible dès le diagnostic au sein des tumeurs *EGFR* mutées et qui présenteront une résistance secondaire au moment de leur exposition aux TKIs, par un effet de pression sélective [43]. Ces clones ne sont pas retrouvés lorsqu'une technique de séquençage direct, moins sensible, est utilisée. Enfin, le niveau d'invasion des cellules tumorales pourrait être

variable au sein d'une même tumeur, avec une progression des altérations moléculaires oncogéniques, comme suggéré dans une observation d'un adénocarcinome broncho-pulmonaire porteur d'une délétion de l'exon 19 de l'*EGFR*, à l'état hétérozygote dans les zones d'hyperplasie adénomateuse atypique et de carcinome bronchiolo-alvéolaire, et à l'état homozygote dans les zones papillaires [163].

I.2. Hétérogénéité des lésions broncho-pulmonaires pré-tumorales

La compréhension de l'hétérogénéité tumorale des cancers broncho-pulmonaires invasifs doit prendre en compte les résultats des analyses moléculaires conduites sur les lésions considérées comme pré-tumorales. Le paradigme de la carcinogenèse pulmonaire est celui de l'acquisition par une cellule pulmonaire non-tumorale d'une mutation oncogénique unique, précoce, conduisant à une croissance cellulaire *clonale*, les cellules tumorales pouvant acquérir des altérations moléculaires supplémentaires, non oncogéniques, au cours de leurs divisions successives et de leur progression métastatique [8]. L'instabilité tissulaire propre à l'épithélium respiratoire, associée ou non au tabagisme, conduit au développement de lésions pré-tumorales - appelées dysplasies - de grade variable - ou carcinome *in situ* pour les carcinomes épidermoïdes et hyperplasie adénomateuse atypique et adénocarcinome *in situ* (anciennement carcinome bronchiolo-alvéolaire pur) pour les adénocarcinomes invasifs [4, 5, 9, 164].

L'évolutivité de ces lésions vers une tumeur invasive est cependant incertaine, mais leur existence sur de larges régions voire l'ensemble de l'épithélium respiratoire explique la possibilité de développement de plusieurs lésions tumorales synchrones ou successives (métachrones), partageant possiblement certaines anomalies moléculaires (cancérogenèse en champ) [165]. L'acquisition d'anomalies moléculaires supplémentaires peut induire la transformation tumorale. Plusieurs lésions peuvent ainsi se développer au sein de ces champs de cancérogenèse. Le traitement chirurgical des lésions emportant au minimum un lobe pulmonaire permet le traitement de l'ensemble de la zone dysplasique péri-tumorale et évite les récurrences locales, pouvant sur le plan moléculaire, être clonales avec la tumeur traitée (récurrences métastatiques), ou être indépendantes (tumeurs primitives multiples), tout en partageant certaines caractéristiques avec la tumeur traitée, étant développées au sein du même champ de dysplasie [166, 167].

Plusieurs études ont rapporté les résultats d'analyse des mutations oncogéniques dans des lésions pré-tumorales d'adénocarcinome broncho-pulmonaire. Dans une étude japonaise portant sur 134 lésions opérées chez 74 patients, la fréquence des mutations activatrices de l'*EGFR* était de 3% dans les lésions d'hyperplasie adénomateuse atypique, de 11% dans les lésions d'adénocarcinome *in situ*, et de 42% dans les lésions d'adénocarcinome invasif [168]. Ces données suggèrent soit que les lésions porteuses de mutations de l'*EGFR* progressent plus rapidement vers des lésions invasives, soit que les adénocarcinomes avec mutation de l'*EGFR* ne se développent pas à partir de lésions de type hyperplasie adénomateuse atypique, soit que les mutations *EGFR* sont tardives dans le processus de carcinogenèse, ce qui va toutefois à l'encontre de leur caractère oncogénique [168]. A l'inverse, les mutations de *KRAS*, mutuellement exclusives avec celles de l'*EGFR*, étaient retrouvées dans 27% des lésions pré-tumorales, 17% des carcinomes bronchiolo-alvéolaires, et 10% des adénocarcinomes invasifs. Les mutations de *KRAS* pourraient ainsi, chez les patients asiatiques, être plus précoces dans la carcinogenèse. En cas de lésions multiples chez un même patient (n=24), les mutations étaient différentes d'une lésion à l'autre dans la moitié des cas. Les données de cette étude restent cependant limitées du fait de l'utilisation du séquençage direct, peu sensible pour détecter des mutations présentes dans une faible proportion de cellules au sein des échantillons tumoraux, et ce malgré la microdissection. Cependant, une étude à la méthodologie similaire retrouvait des résultats comparables en utilisant une technique de génotypage plus sensible basée sur la PCR

[169]. Ces données suggèrent en outre la possibilité de tumeurs pulmonaires développées à partir de mécanismes oncogéniques différents chez un même individu.

I.3. Hétérogénéité inter-tumorale: cancers broncho-pulmonaires multiples

La présence de plusieurs lésions de cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules au sein du parenchyme pulmonaire, de façon synchrone ou métachrone, peut être le fait soit de tumeurs multiples primitives, développées indépendamment - et ainsi non clonales -, soit de métastases avec une lésion principale primitive pulmonaire et une lésion métastatique - les deux lésions étant clonales. Le cancer broncho-pulmonaire est le second cancer le plus fréquent après chirurgie d'un premier cancer broncho-pulmonaire [170].

I.3.1 Aspects cliniques

1.3.1.1. Epidémiologie

Les cancers broncho-pulmonaires multiples métachrones surviennent chez 0,8% à 15% des patients avec un antécédent de cancer broncho-pulmonaire, la variabilité de ces chiffres étant liée au mode de recrutement des séries publiées (autopsies, registres des cancers, cohortes chirurgicales) et au délai de survenue choisi - 1 mois, 3 mois, 6 mois, voire 12 mois [171, 172]. Leur incidence est en augmentation du fait de l'accroissement du nombre de patients diagnostiqués avec un premier cancer broncho-pulmonaire de stade précoce, à la meilleure survie des patients après prise en charge chirurgicale, à l'amélioration de la morbidité et de la mortalité péri-opératoires, et possiblement à la réalisation de traitements adjuvants permettant un meilleur contrôle local et systémique.

Les cancers broncho-pulmonaires synchrones sont également devenus plus fréquents du fait de la meilleure sensibilité des techniques d'imagerie (tomodensitométrie spiralée, tomographie par émission de positons) et d'endoscopie (auto-fluorescence) [173]. Les cancers broncho-pulmonaires multiples synchrones ont une présentation avec seulement deux lésions parenchymateuses pulmonaires dans la moitié des cas [174].

1.3.1.2. Stadification

La stadification des cancers broncho-pulmonaires multiples est complexe. La survie à 5 ans de ces patients est défavorable par rapport à celle des patients porteurs de tumeurs uniques de même taille (19-28% *versus* 48-54%) [175-178]. Dans le système de stadification proposé par l'*International Association for the Study of Lung Cancer* en 2009, les tumeurs multiples synchrones localisées dans le même lobe correspondent à un stade T3, celles localisées dans un lobe différent homolatéral, à un stade T4, celles situées dans le poumon controlatéral, à un stade M1a [176-178]. Cette stadification considère de façon implicite que toutes les lésions tumorales multiples synchrones sont métastatiques, et ne prend ainsi pas en compte les phénomènes de cancérogénèse en champ. Les lésions multiples primitives indépendantes sont au contraire stadifiées TxM0.

1.3.1.3. Classifications anatomo-cliniques

Afin de distinguer tumeurs broncho-pulmonaires multiples primitives indépendantes et métastases, des critères anatomo-cliniques ont été développés en 1975 par Martini et Melamed au *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* (**Tableau 2**) [179]. Ces critères, adaptés de ceux proposés par Warren et Gate pour les carcinomes de la sphère oto-rhino-laryngologique, ont été proposés à partir d'une série chirurgicale de 50 patients opérés de cancers broncho-pulmonaires

multiples, parmi lesquels 18 présentaient des tumeurs synchrones, et 32 des tumeurs métachrones. L'histologie tumorale était identique dans 31 cas, et différente dans 19 cas. Les auteurs ont analysé les caractéristiques cliniques, anatomiques, histologiques, et évolutives de ces lésions. Les principaux critères choisis pour définir des tumeurs broncho-pulmonaires multiples indépendantes étaient 1) un type histologique différent, 2) en cas d'histologie identique, une localisation dans des segments pulmonaires différents, la présence, associée à la tumeur invasive, d'un foyer de carcinome *in situ*, l'absence d'extension lymphangitique commune ou de métastases systémiques, et 3) pour les lésions métachrones, un intervalle diagnostique supérieur à 2 ans [179]; en effet, après traitement d'un cancer broncho-pulmonaire, les récives métastatiques sont deux à trois fois plus fréquentes que les seconds cancers métachrones (27-39% *versus* 10-12% après résection chirurgicale de tumeur de stade I [180, 181]), mais leur incidence diminue au cours du temps, étant maximale dans les deux années suivant la première chirurgie [182]. Ces critères ont été définis à une époque où le carcinome épidermoïde était le type histologique le plus fréquent, et ne comportaient aucune donnée moléculaire.

L'*American College of Chest Physicians* a actualisé en 2003 les critères de Martini-Melamed [182], en en conservant les principaux éléments: type histologique, extension ganglionnaire médiastinale et métastatique, localisation tumorale (lobe identique ou différent), et intervalle diagnostique (2 à 4 ans) pour les lésions métachrones. Malgré l'absence de caractérisation moléculaire systématique des cancers broncho-pulmonaires à cette époque, le critère d'altérations moléculaires différentes était ajouté pour définir les tumeurs broncho-pulmonaires primitives indépendantes.

Tableau 2: Critères de Martini-Melamed [179] et de l'*American College of Chest Physicians* [182].

Table III. Criteria for diagnosis

Metachronous tumors

- A. Histology different
- B. Histology the same, if:
 1. Free interval between cancers at least 2 years or
 2. Origin from carcinoma *in situ* or
 3. Second cancer in different lobe or lung, but:
 - a. No carcinoma in lymphatics common to both
 - b. No extrapulmonary metastases at time of diagnosis

Synchronous tumors

- A. Tumors physically distinct and separate
- B. Histology:
 1. Different
 2. Same, but in different segment, lobe, or lung, if:
 - a. Origin from carcinoma *in situ*
 - b. No carcinoma in lymphatics common to both
 - c. No extrapulmonary metastases at time of diagnosis

Table 2—Definition of Satellite Nodules, MPLCs, and Pulmonary Metastases

- Satellite nodules from primary tumor
 - Same histology
 - And same lobe as primary cancer
 - And no systemic metastases
- MPLCs
 - Same histology, anatomically separated
 - Cancers in different lobes
 - And no N2,3 involvement
 - And no systemic metastases
 - Same histology, temporally separated
 - ≥ 4-yr interval between cancers
 - And no systemic metastases from either cancer
 - Different histology
 - Different histologic type
 - Or different molecular genetic characteristics
 - Or arising separately from foci of carcinoma *in situ*
- Hematogenously spread pulmonary metastases
 - Same histology and multiple systemic metastases
 - Same histology, in different lobes
 - And presence of N2,3 involvement
 - Or < 2-yr interval

1.3.1.4. Impact thérapeutique

Face à un patient présentant de façon synchrone ou métachrone plusieurs cancers broncho-pulmonaires, l'une des principales questions pour le clinicien est de déterminer si ces tumeurs

correspondent à des tumeurs primitives indépendantes, pour lesquelles une résection chirurgicale pourra être potentiellement curative, ou à des métastases, nécessitant une chimiothérapie.

La plupart des séries de cancers broncho-pulmonaires multiples rapportées dans la littérature sont chirurgicales et, même pour celles publiées récemment, basées sur les critères de Martini-Melamed pour distinguer métastases et tumeurs primitives indépendantes (**Tableaux 3 et 4**, pages suivantes). En pratique, la chirurgie des cancers broncho-pulmonaires multiples est souvent réalisée dans l'hypothèse - favorable au plan pronostique - de tumeurs primitives indépendantes [183]. L'impact de la distinction entre tumeurs multiples primitives et métastases n'a pas été évalué de façon prospective. La survie à 5 ans en cas de cancers broncho-pulmonaires métachrones est supérieure à celle observée en cas de cancers multiples synchrones (11%) (**Tableaux 3 et 4**, pages suivantes).

I.3.2. Données moléculaires

Au-delà des critères anatomo-cliniques, la distinction entre tumeurs broncho-pulmonaires multiples primitives et métastases est basée sur les analyses de clonalité des différentes lésions tumorales. Les cellules de tumeurs métastatiques sont clonales, c'est-à-dire dérivées d'une même cellule parente, et sont ainsi porteuses d'altérations moléculaires oncogéniques et non-oncogéniques identiques (**Figure 6**) [166, 167]. Au contraire, les cellules de tumeurs multiples indépendantes seront porteuses d'altérations moléculaires différentes.

Figure 6: Clonalité des tumeurs épithéliales multiples: les tumeurs primitives multiples présentent des altérations moléculaires différentes, les tumeurs métastatiques - clonales - des caractéristiques moléculaires identiques [166].

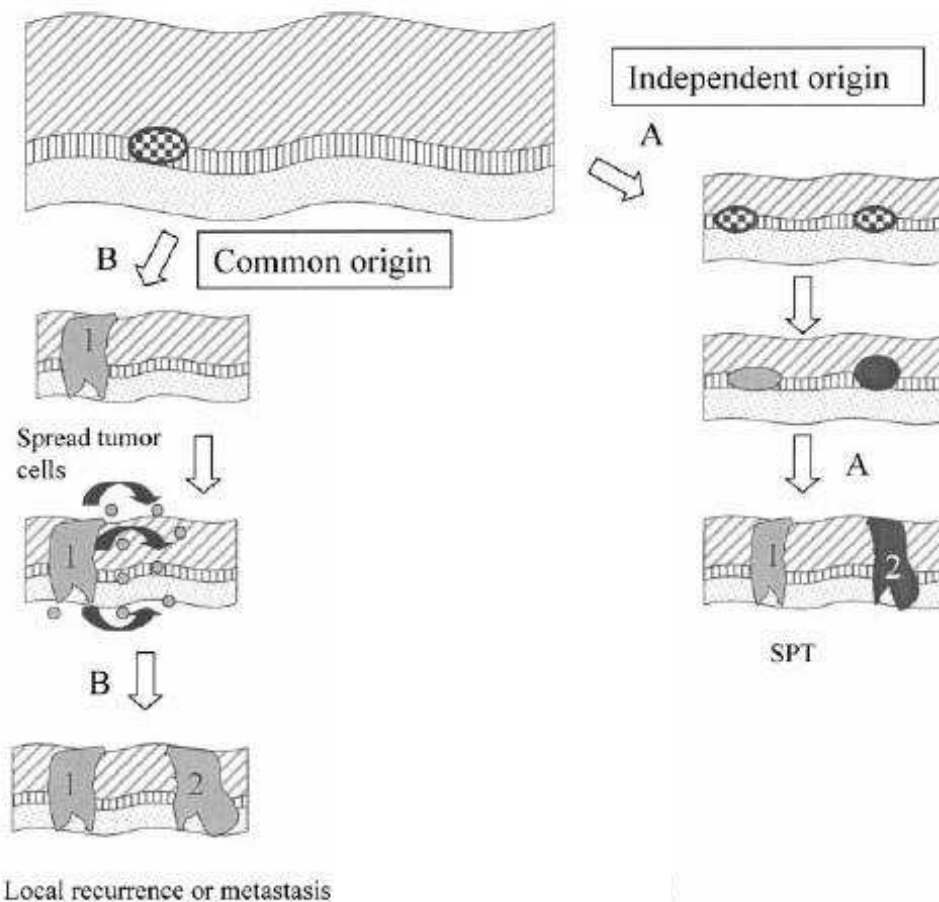


Tableau 3: Séries cliniques de cancers broncho-pulmonaires multiples synchrones. ND : non disponible ; MSKCC : *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*.

| Auteur | Ref. | Année | n | Type histologique | | Localisation | | Chirurgie | | | Survie | |
|--------------------|-------|-------|-----|-------------------|-----------|--------------|------------|-----------|---------------|----------------|---------|---------|
| | | | | similaire | différent | unilatérale | bilatérale | index | second cancer | médiane (mois) | à 3 ans | à 5 ans |
| Martini* (MSKCC) | [179] | 1975 | 18 | 72% | 18% | 78% | 22% | 100% | 83% | 24 | 37% | 28% |
| Mathisen | [184] | 1984 | 10 | ND | ND | 0% | 100% | 100% | 100% | 15 | 10% | 0% |
| Wu | [185] | 1984 | 10 | 50% | 50% | 90% | 10% | 100% | 100% | 29 | 48% | 35% |
| Ferguson | [186] | 1985 | 28 | 68% | 32% | 39% | 61% | 100% | 68% | ND | ND | ND |
| Deschamps | [187] | 1990 | 36 | 33% | 67% | 86% | 14% | 100% | 100% | 14 | 27% | 16% |
| Rosengart* (MSKCC) | [188] | 1991 | 33 | 48% | 52% | 76% | 24% | 100% | 100% | 38 | 55% | 44% |
| Verhagen | [189] | 1994 | 15 | 73% | 27% | 60% | 40% | 100% | 100% | 20 | 26% | 15% |
| Ribet | [190] | 1995 | 24 | 58% | 42% | 37% | 63% | 100% | 63% | 15 | 18% | 0% |
| Angeletti | [191] | 1995 | 18 | 33% | 67% | 56% | 44% | 100% | 100% | 48 | 63% | 46% |
| Antakli | [192] | 1995 | 26 | ND | ND | 46% | 54% | 100% | 100% | 15 | 12% | 12% |
| Adebonojo | [171] | 1997 | 15 | 80% | 20% | 67% | 33% | 100% | 100% | 43 | 58% | 0% |
| Okada | [193] | 1997 | 28 | 43% | 57% | 75% | 25% | 100% | 100% | >60 | 95% | 70% |
| van Rens | [175] | 2000 | 73 | 59% | 41% | 49% | 51% | 100% | 100% | 24 | 37% | 20% |
| Rea | [194] | 2001 | 19 | 68% | 32% | 47% | 53% | 100% | 100% | 33 | 52% | 20% |
| Aziz | [195] | 2001 | 10 | 70% | 30% | 60% | 40% | 70% | 70% | 31 | 40% | 10% |
| Nakata | [196] | 2004 | 26 | 100% | 0% | 35% | 65% | 100% | 100% | >60 | 92% | ND |
| Tsunezuka | [197] | 2004 | 19 | 50% | 50% | 0% | 100% | 100% | 100% | 90 | 82% | 69% |
| Chang | [198] | 2007 | 92 | 88% | 12% | 88% | 12% | 100% | 100% | 36 | 50% | 35% |
| Trousse | [199] | 2007 | 125 | 83% | 17% | 27% | 73% | 100% | 100% | 35 | 48% | 34% |
| Rostad | [200] | 2008 | 94 | 90% | 10% | 99% | 1% | 100% | 100% | ND | ND | ND |
| Riquet | [183] | 2008 | 118 | 64% | 36% | 92% | 8% | 100% | 100% | ND | ND | 23% |
| Voltonini | [201] | 2009 | 43 | 63% | 37% | 35% | 65% | 100% | 100% | 32 | 41% | 34% |
| Jung | [202] | 2010 | 32 | 44% | 56% | 72% | 28% | 100% | 100% | 50 | 66% | 46% |
| Finley* (MSKCC) | [203] | 2010 | 175 | 83% | 17% | 74% | 26% | 100% | 100% | 67 | 64% | 48% |

* chevauchement des périodes d'inclusion

Tableau 4: Séries cliniques de cancers broncho-pulmonaires multiples métachrones. ND : non disponible ; MSKCC : *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*.

| Auteur | Ref. | Année | N | Intervalle diagnostique | Type histologique | | Localisation | | Chirurgie | | Survie à partir de la tumeur index | | | Survie à partir de la seconde tumeur | | |
|--------------------|-------|-------|-----|-------------------------|-------------------|-----------|--------------|------------|-----------|---------------|------------------------------------|---------|---------|--------------------------------------|---------|---------|
| | | | | | similaire | différent | unilatérale | bilatérale | index | second cancer | médiane (mois) | à 3 ans | à 5 ans | médiane (mois) | à 3 ans | à 5 ans |
| Martini* (MSKCC) | [179] | 1975 | 32 | 4-192 | 68% | 32% | 9% | 81% | 100% | 100% | > 60 | 72% | 54% | 12 | 20% | 11% |
| Mathisen | [184] | 1984 | 80 | 4-208 | ND | ND | ND | ND | 100% | 100% | 76 | 82% | 60% | 28 | 40% | 33% |
| Wu | [185] | 1984 | 20 | 4-48 | 30% | 70% | 40% | 60% | 100% | 100% | ND | ND | ND | 26 | 63% | 42% |
| Mousset | [204] | 1989 | 68 | ND | 37% | 63% | ND | ND | 100% | 50% | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Deschamps | [187] | 1990 | 44 | 4-90 | 70% | 30% | 55% | 45% | 100% | 100% | 80 | 80% | 55% | 30 | 48% | 33% |
| Rosengart* (MSKCC) | [188] | 1991 | 78 | 12-228 | 65% | 35% | 34% | 66% | 100% | 100% | 65 | 87% | 70% | 24 | 30% | 23% |
| Wassmer | [205] | 1991 | 11 | 9-180 | 64% | 36% | 64% | 36% | 100% | 73% | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Verhagen | [189] | 1994 | 40 | 7-288 | 63% | 37% | 60% | 40% | 100% | 83% | 72 | 83% | 53% | 15 | 33% | 18% |
| Ribet | [190] | 1995 | 51 | ND | 80% | 20% | 40% | 60% | 100% | 40% | ND | ND | 58% | 12 | 24% | 17% |
| Angeletti | [191] | 1995 | 19 | 6-124 | 73% | 27% | 32% | 68% | 100% | 100% | >70 | 95% | 77% | 21 | 40% | 25% |
| Antakli | [192] | 1995 | 39 | 5-218 | ND | ND | 33% | 67% | 100% | 100% | ND | ND | ND | 21 | 33% | 23% |
| van Merbeeck | [206] | 1996 | 23 | 28-81 | 48% | 52% | ND | ND | 100% | 52% | 50 | 80% | 67% | 14 | 48% | 30% |
| Adebonojo | [171] | 1997 | 37 | 12-175 | 54% | 46% | 27% | 73% | 97% | 97% | 83 | 83% | 75% | 48 | 53% | 37% |
| Okada | [193] | 1997 | 29 | 8-128 | 63% | 37% | ND | ND | 100% | 100% | > 60 | 87% | 66% | 28 | 41% | 33% |
| Rea | [194] | 2001 | 61 | 2-201 | 68% | 32% | 28% | 72% | 100% | 100% | >120 | 89% | 85% | 66 | 62% | 51% |
| Aziz | [195] | 2001 | 41 | 20-78 | 65% | 45% | 32% | 68% | 100% | 95% | ND | ND | ND | 49 | 57% | 44% |
| Rice | [172] | 2003 | 49 | 5-103 | 86% | 14% | 35% | 65% | 100% | 63% | > 96 | 96% | 90% | 32 | ND | ND |
| Nakata | [196] | 2004 | 5 | 26-146 | 100% | 0% | 40% | 60% | 100% | 100% | ND | 100% | ND | ND | 77% | ND |
| Tsunezuka | [197] | 2004 | 19 | ND | 67% | 33% | 0% | 100% | 100% | 100% | 167 | 100% | 100% | 114 | 67% | 51% |
| Hishida | [207] | 2006 | 16 | ND | 50% | 50% | ND | ND | 100% | 100% | ND | ND | ND | 38 | 71% | 40% |
| Riquet | [183] | 2008 | 116 | ND | 51% | 49% | 41% | 59% | 100% | 100% | ND | ND | ND | ND | ND | 16% |

* chevauchement des périodes d'inclusion

L'analyse moléculaire de la clonalité des cancers broncho-pulmonaires multiples, pour être informative, doit être basée sur la recherche d'altérations génétiques 1) survenant précocement au cours de la carcinogenèse broncho-pulmonaire, 2) non ubiquitaires dans les cellules tumorales, afin que la probabilité de les retrouver de façon identique dans des lésions primitives indépendantes reste faible, 3) et conservées dans les métastases [208]. En outre, l'hypothèse de travail des analyses de clonalité pour les lésions broncho-pulmonaires est que les cellules tumorales, ou leurs précurseurs, ne se propagent pas par voie aérogène dans l'arbre broncho-pulmonaire.

Aucune analyse intégrative de la clonalité des cancers broncho-pulmonaires multiples n'avait été réalisée avant notre travail. La plupart des études, y compris celles publiées récemment, n'ont pas corrélé les résultats des analyses de clonalité avec les critères anatomo-cliniques. Les marqueurs moléculaires utilisés pour définir la clonalité ne répondaient pas toujours aux critères énumérés ci-dessus, la plupart étant ubiquitaires dans les cellules tumorales broncho-pulmonaires: analyse de la ploïdie cellulaire [192, 209], analyses partielles de perte d'hétérozygotie, notamment des régions chromosomiques 3p, 9p et 17p [210, 211, 215, 218, 219-221, 224], statut mutationnel de *KRAS* et *EGFR* [168, 223] (**Tableau 5**). En revanche, l'analyse des mutations de *TP53* était informative dans ce contexte: ces mutations sont en effet identifiées dans plus de 50% des cancers broncho-pulmonaires, et correspondent à de multiples substitutions nucléotidiques distribuées sur l'ensemble du gène. La probabilité que deux tumeurs broncho-pulmonaires primitives indépendantes présentent une mutation similaire de ce gène est inférieure à 1% ; l'analyse de *TP53* permettait ainsi de différencier les cancers broncho-pulmonaires primitifs des cancers broncho-pulmonaires métastatiques dans 35 à 66% des cas, avec une bonne corrélation avec les analyses de perte d'hétérozygotie et, dans deux études, avec les critères de Martini-Melamed [208, 214-219, 222, 224].

Tableau 5: Etudes de clonalité en cas de cancer broncho-pulmonaire multiple. LOH: perte d'hétérozygotie

| Auteur | Année | Ref. | n | | Analyses |
|-----------|-------|-------|-----------|------------|---------------------------------|
| | | | synchrone | métachrone | |
| Ichinose | 1991 | [209] | 14 | 0 | Ploïdie |
| Lau | 1997 | [208] | 2 | 0 | <i>TP53</i> , <i>KRAS</i> |
| Mitsudomi | 1997 | [214] | 0 | 16 | <i>TP53</i> |
| Hiroshima | 1998 | [215] | 19 | 11 | <i>TP53</i> , LOH |
| Wang | 1999 | [216] | 6 | 0 | <i>TP53</i> , <i>KRAS</i> |
| Matsuzoe | 1999 | [217] | 20 | 0 | <i>TP53</i> |
| Shimizu | 2000 | [218] | 14 | 0 | <i>TP53</i> , LOH |
| Holst | 1998 | [219] | 28 | 0 | <i>KRAS</i> , <i>TP53</i> , LOH |
| Shin | 2001 | [220] | 5 | | LOH, <i>KRAS</i> , <i>TP53</i> |
| Huang | 2001 | [221] | 4 | 5 | LOH |
| van Rens | 2002 | [222] | 21 | 10 | <i>TP53</i> |
| Tang | 2003 | [210] | 12 | 7 | LOH |
| Dacic | 2005 | [211] | 20 | 0 | LOH |
| Yoshida | 2005 | [168] | 24 | 0 | <i>EGFR</i> , <i>KRAS</i> |
| Ryoo | 2006 | [212] | 1 | 0 | <i>EGFR</i> |
| Chang | 2007 | [213] | 55 | 3 | <i>TP53</i> , <i>EGFR</i> |
| Ruiz | 2007 | [223] | 3 | 0 | CGH, <i>EGFR</i> , <i>KRAS</i> |
| Wang | 2009 | [224] | 18 | 12 | <i>TP53</i> , LOH |

II. Travail de recherche: analyse génomique, mutationnelle et histologique intégrative de l'hétérogénéité inter- et intra-tumorale des cancers broncho-pulmonaires

II.1. Hétérogénéité inter-tumorale: cancers broncho-pulmonaires multiples

II.1.1. Evaluation de la clonalité à partir des mutations oncogéniques de l'*EGFR* et de *KRAS*

La première étape de notre travail a été initiée à partir de la constatation de l'existence de patients atteints d'adénocarcinomes broncho-pulmonaires multiples porteurs de mutations oncogéniques différentes, à partir des données du génotypage de routine de l'*EGFR* et de *KRAS* réalisé au *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*.

Nous avons identifié dans les bases de données de l'institution les patients opérés plus d'une fois de cancer broncho-pulmonaire, pour lesquels le génotypage avait mis en évidence des mutations de l'*EGFR* et/ou de *KRAS* différentes. Sur la base des études de clonalité rapportées antérieurement dans la littérature, nous avons émis l'hypothèse que ces tumeurs porteuses de mutations oncogéniques différentes, correspondaient à des tumeurs primitives indépendantes. Nous avons analysé la valeur des deux classifications cliniques existantes (*Martini-Melamed* et *American College of Chest Physicians*), ainsi que de l'analyse histopathologique détaillée de la morphologie tumorale, incluant la quantification des sous-types histologiques [67], pour porter le diagnostic de tumeurs primitives indépendantes.

Les résultats de cette analyse sont détaillés dans l'article: **N. Girard, C. Deshpande, CG. Azzoli, V. Rusch, WD. Travis, M. Ladanyi, W. Pao. Use of epidermal growth factor receptor/Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog mutation testing to define clonal relationships among multiple lung adenocarcinomas: comparison with clinical guidelines. *Chest* 2010;137:46-52**

Brièvement, sur les 7 patients atteints de cancers broncho-pulmonaires multiples inclus dans cette analyse, les deux classifications anatomo-cliniques concluaient sur le statut des tumeurs multiples - tumeurs primitives indépendantes ou métastases -, de façon différente pour 2 patients, et ne pouvaient porter de diagnostic pour 1 patient. L'analyse histopathologique détaillée de la morphologie tumorale était différente dans tous les cas, soit en terme de sous-type histologique prédominant, soit sur une proportion relative différente des sous-types présents dans la tumeur. Ces résultats suggéraient ainsi, outre la valeur limitée des critères anatomo-cliniques pour distinguer tumeurs primitives multiples et métastases pulmonaires, l'intérêt potentiel de l'analyse histo-pathologique détaillée dans ce contexte.

Ce travail restait néanmoins limité par la faible valeur du statut mutationnel *EGFR* et *KRAS* pour évaluer le degré de clonalité des cancers broncho-pulmonaires multiples, du fait 1) de leur présence dans seulement 50% des cas de cancers broncho-pulmonaires, 2) de leur fréquence malgré tout élevée avec un risque significatif d'observer, de manière fortuite, une mutation identique dans deux tumeurs indépendantes.

II.1.2. Evaluation de la clonalité à partir des profils génomiques

La seconde étape de notre travail a été de comparer les profils génomiques de cancers broncho-pulmonaires multiples, obtenus par hybridation génomique comparative. Les profils génomiques, en caractérisant, pour chaque région chromosomique, les amplifications et les délétions alléliques de l'ADN, permettent de définir le degré de clonalité entre cellules tumorales issues de cancers multiples. Les tumeurs métastatiques, résultats de la division mitotique d'une cellule tumorale parente, présentent des profils génomiques similaires, contrairement aux tumeurs primitives indépendantes, qui ont des profils génomiques différents.

Une méthode d'analyse spécifique des données issues des puces d'hybridation génomique comparative (array CGH) a été développée par l'équipe du *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* pour évaluer la clonalité de tumeurs multiples [225-228]. Le profil génomique obtenu par aCGH de haute résolution est normalisé pour individualiser un total de 15 000 régions alléliques sur l'ensemble des 22 paires de chromosomes somatiques. Les polymorphismes connus du nombre de copies alléliques et les variations de signal sont éliminés. Un algorithme de segmentation circulaire binaire est ensuite appliqué, comparant, pour chaque gain ou perte allélique au sein de chaque segment chromosomique, la position relative des points de cassure, en prenant en compte l'amplitude du signal par rapport au signal de base. Si la différence de position ou de longueur de l'altération chromosomique est significative, le segment est inclus dans l'analyse. Un *likelihood ratio* est ainsi établi pour quantifier le degré de clonalité entre les cancers multiples. Un ratio élevé (supérieur à 100) indique des profils génomiques similaires et est caractéristique de lésions clonales, métastatiques. Afin d'intégrer les potentielles variations de distribution des valeurs du *likelihood ratio* et de réaliser un contrôle interne des données, la distribution des ratios pour chaque paire tumorale issue de patients individuels est comparée à une distribution de référence pour l'absence de clonalité, obtenue à partir de la comparaison des profils de paires de tumeurs issues de patients différents.

Afin de collecter des échantillons congelés de cancers broncho-pulmonaires multiples, nous avons mis en place un protocole d'étude spécifique, ayant fait l'objet d'une validation par l'*Institutional Review Board* de l'institution (obtention d'un Waiver : WA0003-08 et d'une autorisation d'utilisation d'échantillons biologiques spécifique HBUC: HBS2008006). Nous avons collecté ainsi 42 échantillons de cancers broncho-pulmonaires multiples opérés chez 20 patients, 18 patients ayant été opérés de 2 tumeurs, et 2 patients ayant été opérés de 3 tumeurs. Le nombre de patients inclus a été faible en regard du nombre total de patients ayant été opérés dans l'institution de tumeurs multiples (559 patients sur la période 1997-2007), en particulier du fait, pour les tumeurs synchrones, de la conservation dans la banque de tumeurs uniquement d'échantillons de la lésion principale. Au total, 6 patients étaient porteurs de tumeurs synchrones et 14 de tumeurs métachrones. Un total de 24 paires de cancers broncho-pulmonaires multiples a donc été analysé.

Les échantillons tumoraux collectés ont fait l'objet d'une relecture histo-pathologique pour vérification de la présence de cellules tumorales en proportion suffisante (plus de 70%). L'ADN tumoral a été extrait et utilisé pour la réalisation des profils génomiques sur puce aCGH Agilent 244K. Le profil mutationnel a été établi par l'analyse des mutations les plus fréquentes des gènes de la voie de signalisation de l'EGFR, en utilisant une technique de PCR suivie d'une analyse des amplicons en spectrométrie de masse (technologie SEQUENOM). Tous les exons du gène *TP53* ont été séquencés. Le tissu non-tumoral a été utilisé pour établir le caractère somatique des mutations identifiées.

Les profils génomiques étaient interprétables pour 22 paires de tumeurs. Les ratios de clonalité étaient en faveur de cancer broncho-pulmonaire métastatique pour 4 paires, et en faveur de cancers broncho-pulmonaires multiples indépendants pour 14 paires. Pour 4 paires, les ratios de clonalité étaient élevés en faveur de métastases mais restaient dans l'intervalle des valeurs de la distribution de référence des tumeurs multiples indépendantes. Ces profils génomiques ont été définis comme étant équivoques.

Pour les 17 paires de tumeurs pour lesquelles le profil mutationnel était informatif, c'est-à-dire montrant des mutations différentes ou similaires pour un ou plusieurs des gènes explorés, il existait une concordance parfaite des résultats avec ceux des profils génomiques: mutations différentes pour les tumeurs non clonales, et mutations identiques pour les tumeurs clonales. Pour les 4 cas considérés comme équivoques au profil génomique, des mutations somatiques identiques ont été identifiées, ce qui suggérait la clonalité de ces lésions. Les profils mutationnels n'ont identifié aucune mutation somatique pour 7 paires de tumeurs, ne permettant pas de conclusion.

Le diagnostic de cancer broncho-pulmonaire métastatique ou de cancers broncho-pulmonaires primitifs indépendants, obtenu par le profil génomique, était contradictoire avec celui basé sur la classification de Martini-Melamed dans 7/22 (32%) cas. Cette classification avait été établie à une époque où les carcinomes épidermoïdes étaient plus fréquents que les adénocarcinomes, et, 6 des 7 paires pour lesquelles une discordance était mise en évidence correspondaient à des adénocarcinomes multiples.

Afin de faciliter les analyses histo-pathologiques détaillées ci-après, nous avons considéré que les 4 paires de tumeurs ayant des profils génomiques identiques et des mutations identiques étaient clonales (métastases pulmonaires), et que les 9 paires de tumeurs ayant des profils génomiques différents et des mutations différentes étaient indépendantes (cancers broncho-pulmonaires primitifs indépendants). Pour les 4 paires de tumeurs dont les profils génomiques étaient équivoques, mais qui étaient porteuses de mutations somatiques identiques, le diagnostic de cancer broncho-pulmonaire métastatique a été retenu. Deux paires de tumeurs restaient non caractérisées au plan moléculaire, les profils génomiques étant de mauvaise qualité, et aucune mutation n'étant détectée.

Les conclusions de ce travail étaient 1) que les profils génomiques permettent une distinction entre cancer broncho-pulmonaire métastatique et cancers broncho-pulmonaires primitifs indépendants, 2) que les critères anatomo-cliniques conduisent à un diagnostic inexact dans une grande proportion de cas, et 3) que les profils mutationnels pourraient représenter une méthode de substitution plus accessible que les profils génomiques pour évaluer la clonalité des cancers broncho-pulmonaires multiples.

Les résultats de ces analyses ont été publiés dans l'article: **N. Girard, I. Ostrovnaya, C. Lau, B. Park, M. Ladanyi, D. Finley, C. Deshpande, V. Rusch, I. Orlov, WD. Travis, W. Pao, CB. Begg. Genomic and mutational profiling to assess clonal relationships between multiple non-small cell lung cancers. Clin Cancer Res 2009;15:5184-90.**

II.1.3. Analyse histo-pathologique détaillée

La troisième étape du travail a été d'étudier de façon détaillée les caractéristiques histo-pathologiques des paires de cancers broncho-pulmonaires multiples, et de comparer les résultats aux données moléculaires.

L'étude histo-pathologique de chaque échantillon de notre cohorte de cancers broncho-pulmonaires multiples a été réalisée de façon indépendante des analyses moléculaires. Nous avons utilisé d'une part des lames histologiques réalisées sur les fragments congelés effectivement utilisés pour les analyses moléculaires, et d'autre part les lames réalisées sur les échantillons des mêmes tumeurs, fixés en formaline et conservés en paraffine, ayant été utilisés pour le diagnostic histo-pathologique de routine. Toutes ces lames ont été colorées à l'hématoxyline-éosine. Nous avons au préalable vérifié la reproductibilité des résultats des analyses moléculaires - profils génomiques et mutationnels - sur différents échantillons tissulaires issus de régions distinctes de 8 tumeurs de notre cohorte.

Pour les adénocarcinomes, alors que la classification IASLC/ATS/ERS n'était pas encore publiée [5], nous avons utilisé les données de l'étude préliminaire de Motoï et al. [67], suggérant l'intérêt d'une quantification par incréments de 10% des différentes régions morphologiques présentes dans chaque lésion pour déterminer le sous-type histologique prédominant. Nous avons également analysé les différents variants cytologiques des cellules tumorales: cellules claires, mucineuses, ou en bague à chaton. Pour les carcinomes épidermoïdes, l'architecture du stroma et les variants cytologiques étaient pris en compte. Un algorithme décisionnel basé sur ces éléments a été développé pour distinguer cancers broncho-pulmonaires métastatiques et cancers broncho-pulmonaires primitifs indépendants.

Le principal résultat de cette analyse est l'excellente corrélation - 91% - entre les résultats du diagnostic moléculaire et ceux de l'analyse histo-pathologique réalisée sur lames fixées. Les 2 paires pour lesquelles les conclusions étaient discordantes correspondaient pour le premier cas, à des carcinomes épidermoïdes multiples, type histologique pour lequel l'analyse histo-pathologique détaillée reste plus difficile, et pour le second cas, à des tumeurs pour lesquelles le diagnostic moléculaire était basé uniquement sur l'existence de mutations de *KRAS* identiques, en l'absence de profil génomique interprétable.

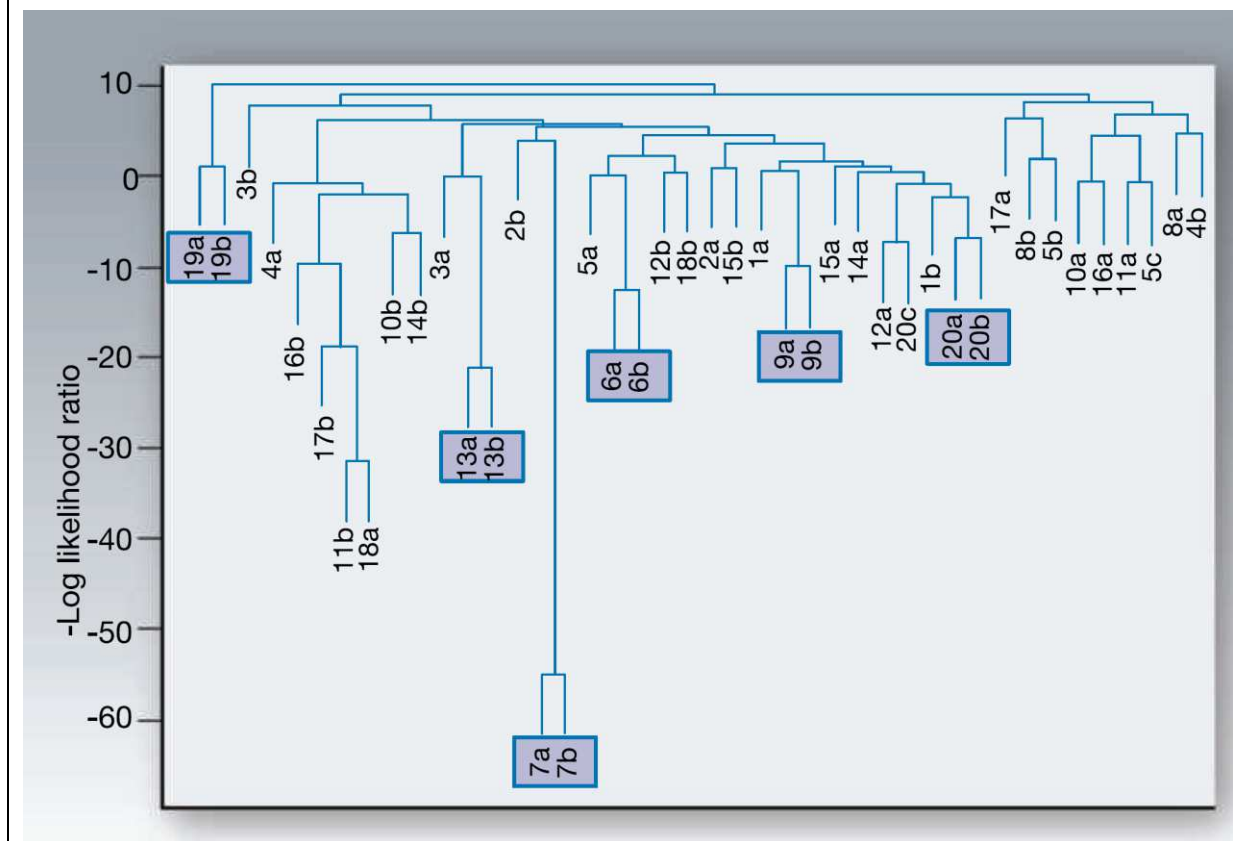
Les résultats de cette analyse sont publiés dans l'article suivant: **N. Girard, C. Deshpande, C. Lau, D. Finley, VW. Rusch, W. Pao, WD. Travis. Comprehensive Histologic Assessment Helps to Differentiate Multiple Lung Primary Nonsmall Cell Carcinomas From Metastases. Am J Surg Pathol 2009;33:1752-64**

II.1.4. Hétérogénéité inter-tumorale: perspectives

Notre étude est la première à avoir analysé une cohorte de cancers broncho-pulmonaires multiples en intégrant les données des profils génomiques, définissant le degré de clonalité de ces lésions, les données des profils mutationnels, et l'analyse histo-pathologique détaillée. Les résultats indiquent une discordance avec les critères standards de Martini-Melamed dans plus de 30% des cas.

Les données des profils génomiques des cancers broncho-pulmonaires multiples de notre série ont récemment fait l'objet d'une réinterprétation statistique par clustering hiérarchique [229]. Sur les 24 paires analysées, 6 paires issues de patients uniques étaient regroupées entre elles, suggérant le diagnostic de métastases ; 4 de ces 6 paires avaient été identifiées comme étant clonales lors de notre première analyse ; 1 de ces 6 paires avait été diagnostiquée comme cancer broncho-pulmonaire métastatique du fait de l'existence de mutations identiques dans les 2 lésions, en l'absence de profil génomique interprétable lors de notre première analyse. Le clustering hiérarchique semble cependant moins spécifique pour étudier le degré de clonalité de cancers multiples, que l'algorithme circulaire binaire utilisé initialement pour interpréter nos données, 1) identifiant une paire de tumeurs (19 a et b) comme étant clonale, alors que le ratio de clonalité, calculé à 3, était en faveur de tumeurs primitives indépendantes, et 2) n'identifiant pas la tumeur 20c comme étant clonale avec les tumeurs 20a et 20b.

Figure 7: Clustering hiérarchique des profils génomiques des cancers broncho-pulmonaires multiples inclus dans notre étude [229].



La mise à disposition de techniques de détection de mutations oncogéniques plus sensibles pourrait permettre d'envisager de nouvelles analyses sur les paires de cancers broncho-pulmonaires multiples de notre cohorte, en particulier la détection de différents clones cellulaires, caractérisés par une mutation oncogénique spécifique, au sein des tumeurs

individuelles. La mise en évidence d'une telle hétérogénéité intra-tumorale est possible par les techniques de PCR ultra-sensible et/ou la détection de cellules tumorales circulantes [43]. L'utilisation de puces SNP aurait pu permettre d'intégrer dans notre analyse un plus grand nombre de mutations, oncogéniques ou non, avec la possibilité d'étudier la chronologie de développement de ces lésions tumorales multiples [230].

Au plan biologique, du fait de l'existence de champs de cancérogenèse au sein du parenchyme pulmonaire, la distinction entre tumeurs clonales métastatiques et tumeurs primitives indépendantes non clonales peut apparaître artificielle, et une situation intermédiaire correspond à celle des tumeurs issues d'un même champ de cancérogenèse, partageant certaines caractéristiques moléculaires tout en étant indépendantes, situation mal caractérisée dans l'analyse de nos profils génomiques, et pouvant expliquer l'existence de ratios de clonalité équivoques. Ainsi une étude a rapporté l'existence d'une mutation de *TP53* sur l'ensemble de l'arbre bronchique d'un patient fumeur [231]. En outre, sans prendre en compte la possibilité de larges champs de cancérogenèse dans le parenchyme pulmonaire, les cancers broncho-pulmonaires multiples pourraient dériver de cellules souches dormantes issues d'une lésion tumorale index [232, 233].

Enfin, une étude récente conduite sur des modèles murins de cancer du sein, de mélanome et de cancer colorectal, a suggéré l'existence de cellules tumorales circulantes agressives capable de recoloniser la tumeur primitive dont elles étaient issues (mécanisme de "*tumor self-seeding*"), voire une autre tumeur multiple considérée comme étant indépendante [234]. Ces mécanismes, médiés par des cytokines responsables de l'adhésion (IL-6 et IL-8) et de l'infiltration (MMP1/collagenase-1 et *actin cytoskeleton component fascin-1*) des cellules tumorales, s'ils existaient pour les cancers broncho-pulmonaires multiples, seraient susceptibles de rendre les analyses de clonalité telles que nous les avons réalisées, plus difficilement interprétables.

En pratique clinique, l'intérêt potentiel de la distinction entre cancers broncho-pulmonaires primitifs indépendants et cancer broncho-pulmonaire métastatique se conçoit en situation préopératoire, et dans ce cas, seuls des échantillons tumoraux de petite taille, prélevés par voie endo-bronchique ou trans-pariétale, sont disponibles. Dans ce contexte, les profils génomiques ne sont pas réalisables, nécessitant des échantillons tumoraux congelés pour extraire une grande quantité d'ADN non fragmenté. Au contraire, les profils mutationnels ont l'avantage de pouvoir être obtenus sur des échantillons tumoraux de très petite taille, cytologiques, en phase liquide ou fixés et conservés en paraffine. La corrélation avec les profils génomiques est excellente. L'augmentation du nombre de mutations analysées pourrait permettre d'améliorer l'informativité de ces profils. Enfin, l'analyse histopathologique détaillée, si elle requiert, comme les profils génomiques, des échantillons tumoraux tissulaires de taille suffisante, a l'avantage de ne pas nécessiter de plateau technique spécifique et d'être informative dans tous les cas. Pour les spécimens archivés, la comparaison des comptes-rendus intégrant la semi-quantification des sous-types histologiques, pourrait suffire. Cette stratégie d'analyse histo-pathologique doit cependant être validée sur des échantillons de petite taille. La reproductibilité doit être évaluée. L'intérêt de l'immunohistochimie doit être étudié.

En conclusion, nos résultats, et principalement la corrélation entre profil mutationnel et analyse histo-pathologique, doivent maintenant être validés sur une cohorte plus large de cancers broncho-pulmonaires multiples. Les conséquences cliniques de ces analyses demeurent incertaines, car en présence de cancers broncho-pulmonaires multiples opérables, une chirurgie est souvent réalisée dans l'hypothèse de tumeurs primitives indépendantes. Le

diagnostic de cancer broncho-pulmonaire métastatique engage possiblement la nécessité d'une chimiothérapie adjuvante et d'une surveillance oncologique plus rapprochée. L'impact clinique de l'utilisation des outils moléculaires à la place des critères de Martini-Melamed reste à évaluer de façon prospective. Notre analyse préliminaire du pronostic des patients de notre cohorte indique une meilleure discrimination entre la survie des patients atteints de tumeurs métastatiques et celle des patients atteints de tumeurs primitives indépendantes par les outils moléculaires.

II.2. Hétérogénéité intra-tumorale

La dernière partie de notre projet avait pour objectif d'évaluer le niveau d'hétérogénéité intra-tumorale d'adénocarcinomes broncho-pulmonaires uniques, selon les mêmes modalités d'analyse que celles décrites précédemment pour les cancers broncho-pulmonaires multiples.

II.2.1. Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, les données sur les corrélations entre aspect histologique et altérations moléculaires ne sont que parcellaires dans les adénocarcinomes broncho-pulmonaires, et sont basées sur l'analyse du sous-type histologique prédominant et l'étude moléculaire d'un fragment tumoral unique [67]. Au-delà du concept de sous-type prédominant, notre analyse histo-pathologique des cancers broncho-pulmonaires multiples suggère au contraire l'importance de chaque composante architecturale pour les analyses moléculaires.

L'accès au tissu tumoral en cas de tumeur broncho-pulmonaire périphérique de stade avancé (ne faisant pas l'objet de résection chirurgicale) est possible par prélèvement cytologique réalisé lors d'une ponction trans-pariétale à l'aiguille. Les échantillons cytologiques obtenus permettent de poser le diagnostic histologique de la tumeur dans la plupart des cas [5]. Certaines données préliminaires suggèrent la possibilité d'étudier certaines caractéristiques moléculaires sur de tels échantillons [235-237]. L'évaluation de l'hétérogénéité moléculaire intra-tumorale apparaît cruciale pour interpréter la représentativité de ces analyses portant sur un fragment tumoral de faible taille.

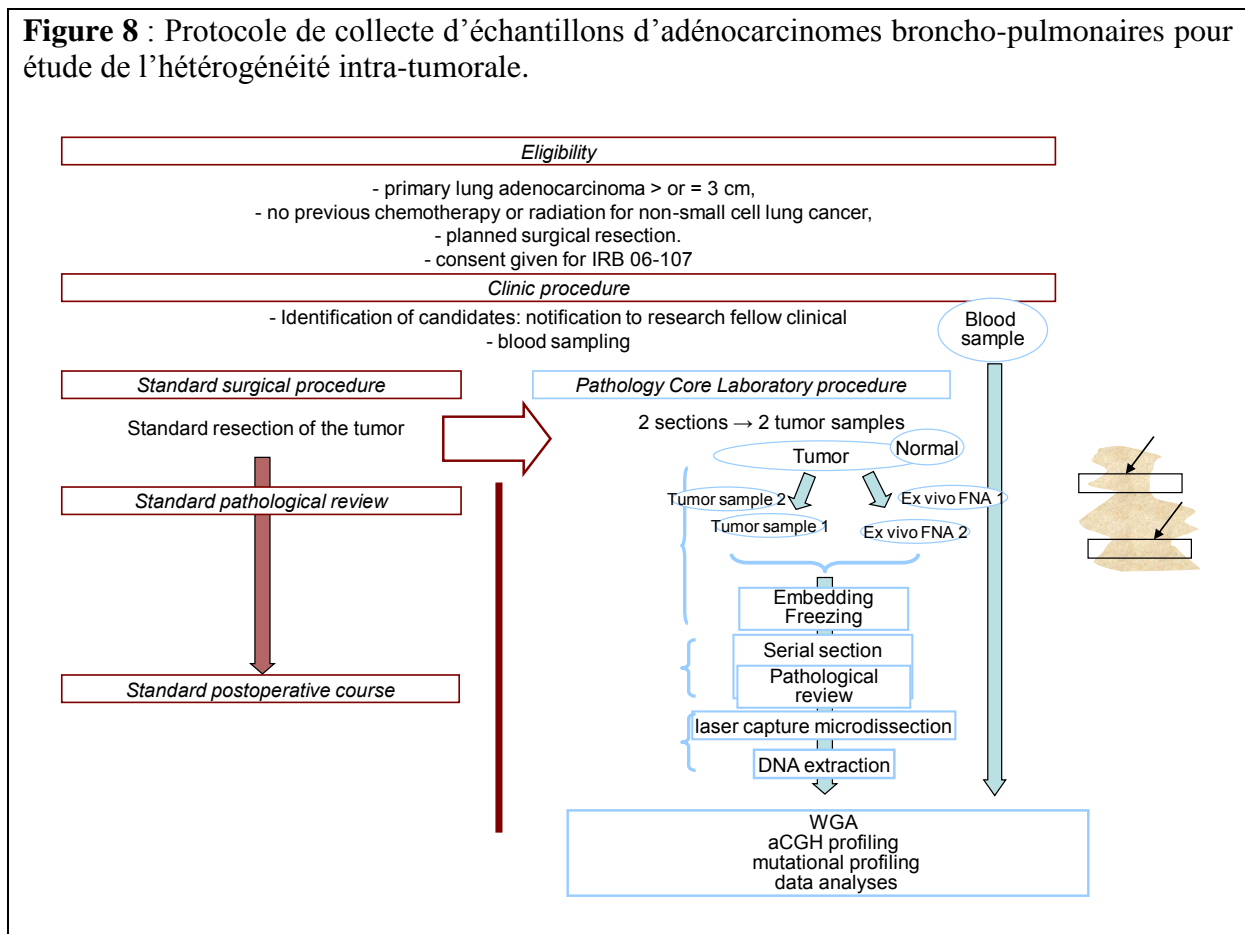
Les objectifs de notre analyse étaient ainsi: 1) d'évaluer l'hétérogénéité « globale » des profils génomiques et mutationnels réalisés sur différentes zones tissulaires d'une même tumeur adénocarcinomeuse ; 2) d'évaluer la possibilité d'établir ces profils sur des prélèvements cytologiques ; et 3) de déterminer les profils génomiques et mutationnels spécifiques à chaque sous-type morphologique (sous-types acinaire, papillaire, à croissance lépidique/bronchiolo-alvéolaire, et solide).

II.2.2. Collecte des échantillons

Nous avons donc mis en place un protocole prospectif de collecte et d'étude d'échantillons tumoraux d'adénocarcinomes broncho-pulmonaires (protocole MSKCC, IRB Waiver: WA0037-08 ; HBUC: HBS2008014). Le plan de cette étude est décrit dans la **Figure 8**. Le protocole a été ouvert en mai 2008 et proposé à tous les patients consécutifs hospitalisés dans le service de chirurgie thoracique pour résection chirurgicale d'une tumeur pulmonaire, diagnostiquée ou non en préopératoire comme étant un adénocarcinome broncho-pulmonaire. Les critères d'inclusion dans l'étude étaient les suivants: (1) chirurgie d'un adénocarcinome pulmonaire primitif, (2) de taille supérieure ou égale à 3 cm, et (3) absence de traitement néo-adjuvant. Les patients sélectionnés pour lesquels le diagnostic histo-pathologique n'était

obtenu qu'en postopératoire étaient inclus dans l'étude uniquement si la lésion était de type adénocarcinome. Le protocole de collecte a consisté en la réalisation *ex vivo*, au bloc opératoire, de 2 prélèvements de tissu tumoral dans des zones différentes de chaque tumeur, de 2 ponctions cytologiques à l'aiguille dans les zones adjacentes à celles biopsiées, et d'un prélèvement de tissu non-tumoral associé à une ponction cytologique en tissu non-tumoral. Les échantillons tissulaires ont été immédiatement inclus dans l'OCT (Tissue-Tek) et congelés pour analyse ultérieure. Un échantillon tissulaire supplémentaire était prélevé de façon optionnelle pour le diagnostic moléculaire de routine. Les éléments cytologiques ont été contrôlés au microscope pour évaluer le contenu en cellules tumorales, et inclus dans le *RNAprotect cell reagent* (Qiagen), avant d'être centrifugés et congelés. Un tube de sang total du patient a été congelé.

Figure 8 : Protocole de collecte d'échantillons d'adénocarcinomes broncho-pulmonaires pour étude de l'hétérogénéité intra-tumorale.



II.2.3. Analyse des échantillons

Les échantillons tissulaires ont été analysés au plan histo-pathologique, avec la réalisation, pour chaque bloc, d'une première coupe sur lame colorée à l'hématoxyline-éosine pour analyse de l'architecture tumorale, puis de 5 coupes jointives sur lame, congelées pour microdissection laser, de 5 coupes sur lame pour extraction de l'ADN (méthode d'extraction standard au phénol), puis d'une dernière coupe sur lame colorée à l'hématoxyline-éosine pour analyse de l'architecture tumorale. Les échantillons cytologiques ont fait l'objet d'une extraction directe de l'ADN.

Les lames histologiques ont été relues par le Dr W. Travis pour évaluation semi-quantitative des différentes composantes architecturales et repérage des zones morphologiques spécifiques d'un sous-type histologique pour microdissection laser. La

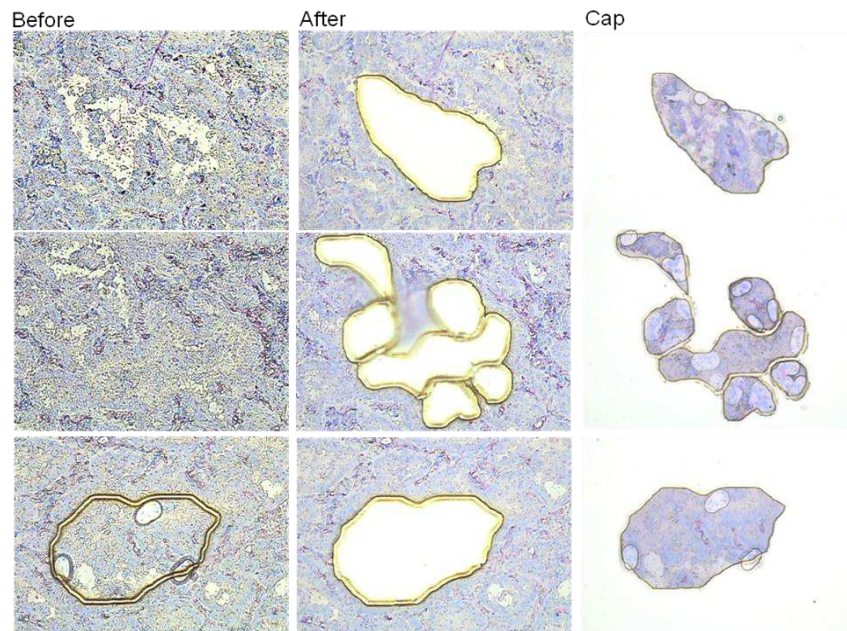
microdissection laser a ensuite été réalisée sur les lames congelées réalisées de façon sous-jacente à la première lame diagnostique. L'ADN a été extrait des cellules micro-disséquées, puis amplifié par *Whole Genome Amplification* (REPLI-G, Qiagen). L'ADN a été utilisé pour la réalisation d'un profil mutationnel sur les mutations les plus fréquemment observées dans les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules, selon le même protocole que celui décrit précédemment pour les cancers broncho-pulmonaires multiples.

II.2.4. Résultats

Nous avons collecté des échantillons tissulaires et cytologiques de 31 adénocarcinomes broncho-pulmonaires opérés entre mai et décembre 2008. Pour chaque tumeur, nous disposons des 2 tranches de section de tissu congelé, d'une tranche de section de tissu normal, de 2 culots cellulaires issus des ponctions à l'aiguille réalisées *ex vivo* au niveau des tranches de section tissulaires, et d'un culot globulaire de tissu normal. Nous disposons d'un troisième échantillon tissulaire tumoral pour 24 tumeurs.

Nous avons réussi à isoler par microdissection laser des cellules tumorales de régions morphologiques spécifiques (acinaires, à croissance lépidique/bronchiolo-alvéolaires, papillaires et solides) pour 15 tumeurs. Pour 5 tumeurs, un seul sous-type morphologique a pu être collecté, alors que pour 10 tumeurs, au moins 2 sous-types morphologiques différents ont été collectés (**Figure 9**).

Figure 9 : Microdissection laser de la tumeur H20, avec collecte de cellules issues de régions d'architecture papillaire (partie supérieure), acinaire (partie centrale), et solide (partie inférieure). La colonne de gauche montre la tumeur avant dissection, la colonne centrale, la tumeur après dissection, et la colonne de droite, les cellules collectées.



Nous devons initialement comparer les profils génomiques de l'ensemble de ces échantillons, mais les résultats obtenus lors de notre étude des cancers broncho-pulmonaires multiples nous ont conduits à ne réaliser pour une première approche qu'un profil mutationnel. Nous avons d'abord évalué l'hétérogénéité « globale » des tumeurs, en comparant les profils des différentes tranches de section et spécimens cytologiques collectés. Douze tumeurs étaient porteuses de mutation activatrice de l'*EGFR* (6 mutations de type

L858R, 6 délétions de l'exon 19), 6 tumeurs étaient porteuses de mutation de *KRAS*, 6 tumeurs de mutations de *TP53* (associée à une mutation *EGFR* dans 4 cas). Aucune mutation de notre panel n'était identifiée dans 11 tumeurs. Les résultats des profils mutationnels étaient identiques dans l'ensemble des échantillons prélevés sur une même tumeur dans 21 (68%) cas. Les discordances entre prélèvements impliquaient une mutation de l'*EGFR* dans 6 cas, une mutation de *KRAS* dans 4 cas, et une mutation de *TP53* dans 2 cas (**Tableau 6**).

Les ponctions cytologiques permettaient l'obtention d'un profil mutationnel dans 95% des cas, dont les données étaient identiques à celles obtenues à partir des tranches de section tissulaires. Les prélèvements cytologiques étaient concordants avec les prélèvements tissulaires adjacents dans 100% des cas.

Enfin, les analyses conduites sur les cellules micro-disséquées issues de régions morphologiques spécifiques montraient, pour les 5 cas ayant fait l'objet de la dissection d'un seul sous-type architectural, des mutations de l'*EGFR* identifiées dans des zones acinaires et papillaires, et une mutation de *KRAS* retrouvée dans une zone de croissance lépidique/bronchiolo-alvéolaire. Ces mutations étaient retrouvées dans les prélèvements tissulaires issus des tumeurs correspondantes pour tous les patients. Pour les 10 tumeurs ayant fait l'objet de la dissection de plusieurs régions architecturales, une hétérogénéité mutationnelle était retrouvée dans 3 (30%) cas.

II.2.5. Perspectives

Ces données sont préliminaires, montrent la faisabilité des prélèvements cytologiques pour évaluer les profils mutationnels, et surtout suggèrent, comme les études précédemment rapportées [161], l'existence d'une hétérogénéité moléculaire dans un tiers des adénocarcinomes broncho-pulmonaires, potentiellement liée à l'hétérogénéité morphologique de ces tumeurs.

Le principal point de discussion est la possibilité d'explications techniques à la non-détection de mutations dans les échantillons identifiés comme étant hétérogènes, toutes les discordances observées impliquant une absence de mutation dans au moins un échantillon tumoral. La technique de recherche de mutations utilisée, par PCR suivie d'une détection de la taille amplicons par spectrométrie de masse (SEQUENOM), est cependant considérée comme étant sensible, avec la possibilité de détection de mutations présentes dans 1-2% des cellules analysées. Les échantillons ont tous été évalués par cette technique de façon répétée, sans modification des résultats. L'utilisation de techniques plus sensibles de séquençage pourrait permettre de limiter ce risque d'erreur technique.

L'absence de différence de profil mutationnel pour la majorité des cellules issues de régions morphologiquement différentes au sein d'une même tumeur est potentiellement liée au fait que les mutations recherchées dans notre étude surviennent précocement dans le processus de carcinogenèse, alors que l'organisation architecturale semble plutôt être le fait de différences dans les profils d'expression ARN [67-75]. Nos résultats ne sont donc pas contradictoires avec le fait qu'un sous-type histologique prédominant au sein d'une tumeur broncho-pulmonaire soit plus fréquemment associé à une mutation oncogénique spécifique.

Tableau 6 : Résultats des profils mutationnels dans les échantillons tissulaires (TISSU0, TISSU1, TISSU2) et cytologiques (CYTO1, CYTO2) des 31 tumeurs incluses dans notre étude. La colonne GLOBAL indique l'existence d'une hétérogénéité intra-tumorale au sein de ces échantillons. Les résultats des profils mutationnels effectués sur des cellules microdisséquées issues de régions morphologiques spécifiques sont également présentés (colonnes de droite).

| ID | TISSU 0 | TISSU 1 | TISSU 2 | CYTO 1 | CYTO 2 | GLOBAL | acinaire | Solide | lépидique | papillaire |
|-----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|-------------------|---------------|---------------|-------------------|
| H1 | exon 19 15pb del | exon 19 15pb del | none | exon 19 15pb del | none | YES | exon 19 15pb del | not collected | not collected | not collected |
| H2 | not collected | None | none | none | none | NO | not collected | not collected | not collected | not collected |
| H3 | not collected | None | none | none | none | NO | not collected | not collected | not collected | not collected |
| H5 | exon 19 15pb del | exon 19 15pb del | exon 19 15pb del | exon 19 15pb del | exon 19 15pb del | NO | none | not collected | not collected | exon 19 15pb del |
| H6 | KRAS G12S | KRAS G12S | KRAS G12S | KRAS G12S | KRAS G12S | NO | not collected | not collected | not collected | not collected |
| H7 | none | KRAS G12C | none | KRAS G12C | none | YES | not collected | not collected | G12C | not collected |
| H8 | exon 19 15 bp del | exon 19 15 bp del | exon 19 15 bp del | exon 19 15 bp del | exon 19 15 bp del | NO | not collected | not collected | not collected | exon 19 15 bp del |
| H9 | exon 19 15 bp del | exon 19 15 bp del | exon 19 15 bp del | exon 19 15 bp del | exon 19 15 bp del | NO | exon 19 15 bp del | None | not collected | exon 19 15 bp del |
| | | TP53 R248Q | TP53 R248Q | TP53 R248Q | TP53 R248Q | NO | none | None | not collected | none |
| H10 | EGFR L858R | EGFR L858R | EGFR L858R | EGFR L858R | EGFR L858R | NO | not collected | not collected | not collected | not collected |
| | | TP53 H193D | TP53 H193D | TP53 H193D | TP53 H193D | | not collected | not collected | not collected | not collected |
| H11 | none | none | none | none | none | NO | not collected | not collected | not collected | not collected |
| H12 | none | None | none | none | none | NO | none | not collected | not collected | not collected |
| H13 | none | None | none | none | none | NO | none | not collected | not collected | none |
| H14 | none | KRAS G12D | KRAS G12D | KRAS G12D | KRAS G12D | YES | none | not collected | not collected | none |
| H15 | EGFR L858R | EGFR L858R | EGFR L858R | EGFR L858R | EGFR L858R | NO | EGFR L858R | not collected | EGFR L858R | not collected |
| H16 | not collected | None | TP53 C242S | none | TP53 C242S | YES | not collected | not collected | not collected | not collected |
| H17 | not collected | None | none | none | none | NO | not collected | not collected | not collected | not collected |
| H18 | not collected | None | none | none | none | NO | not collected | not collected | not collected | not collected |
| H19 | none | EGFR L858R | EGFR L858R | EGFR L858R | EGFR L858R | YES | EGFR L858R | not collected | EGFR L858R | not collected |
| | | TP53 H214R | TP53 H214R | TP53 H214R | TP53 H214R | | TP53 H214R | not collected | TP53 H214R | not collected |
| H20 | KRAS G12C | KRAS G12C | KRAS G12C | KRAS G12C | none | NO | KRAS G12C | KRAS G12C | not collected | KRAS G12C |
| H21 | none | EGFR L858R | EGFR L858R | EGFR L858R | EGFR L858R | YES | EGFR L858R | EGFR L858R | not collected | EGFR L858R |
| H22 | none | None | none | none | none | NO | not collected | not collected | not collected | not collected |
| H23 | none | EGFR L858R | EGFR L858R | EGFR L858R | EGFR L858R | YES | not collected | not collected | not collected | not collected |
| H24 | not collected | none | none | none | none | NO | not collected | not collected | not collected | not collected |
| H25 | none | KRAS G12A | KRAS G12A | KRAS G12A | KRAS G12A | YES | not collected | not collected | not collected | not collected |
| H26 | KRAS G12D | KRAS G12D | KRAS G12D | KRAS G12D | KRAS G12D | NO | not collected | not collected | not collected | not collected |
| H27 | none | none | none | none | none | NO | not collected | not collected | not collected | not collected |
| H28 | exon 19 18bp del | None | exon 19 18bp del | no del | exon 19 18bp del | YES | exon 19 18bp del | not collected | not collected | none |
| | | None | TP53 D259Y | none | TP53 D259Y | | TP53 D259Y | not collected | not collected | TP53 D259Y |
| H29 | not collected | TP53 L188DEL | TP53 L188DEL | TP53 L188DEL | TP53 L188DEL | NO | not collected | not collected | not collected | not collected |
| H30 | none | EGFR L858R | EGFR L858R | EGFR L858R | EGFR L858R | YES | not collected | not collected | not collected | not collected |
| H31 | none | None | none | none | none | NO | none | none | not collected | none |
| H40 | exon 19 15 pb del | exon 19 15pb del | exon 19 15pb del | exon 19 15pb del | exon 19 15pb del | NO | not collected | not collected | not collected | not collected |

Exon 19 15/18 pb del: délétion de 15/18 paires de base dans l'exon 19 de l'*EGFR*

QUATRIÈME PARTIE

Etude génomique intégrative des tumeurs épithéliales du thymus

I. Présentation des tumeurs épithéliales du thymus

I.1. Caractéristiques générales

Les tumeurs épithéliales du thymus sont des tumeurs malignes rares, dont l'incidence est estimée à 0,15/100 000 individus [238]. Ces tumeurs représentent moins de 1% des tumeurs intra-thoraciques, mais près de 20% des tumeurs du médiastin. Leur classification histologique actuelle a été développée par l'Organisation Mondiale de la Santé, et distingue thymomes et carcinomes thymiques. Les thymomes sont des tumeurs mixtes, associant un contingent de cellules épithéliales tumorales, développé à partir des thymocytes, et un contingent de lymphocytes non tumoraux et peu différenciés. Leur classification en sous-types repose sur l'aspect morphologique des cellules tumorales, sur la proportion relative du contingent lymphoïde, et sur la ressemblance de l'architecture du tissu tumoral avec les différentes zones anatomiques du thymus normal [1, 239]. Les carcinomes thymiques primitifs sont encore plus rares, représentant moins de 1% des tumeurs épithéliales du thymus [240]. La classification histologique des carcinomes thymiques distingue carcinomes de haut grade (adénocarcinome, sarcomatoïde, lympho-épithélial) et carcinomes de bas grade (basaloïde, épidermoïde, muco-épidermoïde), en fonction du pronostic, mais ces sous-groupes ont été individualisés à partir de données anciennes et issues de cohortes de très faible effectif. Contrairement aux thymomes, les carcinomes thymiques sont dans la majorité des cas d'emblée invasifs, avec une extension aux structures médiastinales adjacentes dans 80% des cas [240, 241].

Au plan clinique, le traitement des tumeurs épithéliales du thymus repose sur la résection chirurgicale complète, qui est obtenue dans 50% à 70% des cas et, qui représente, avec le stade tumoral évalué par la classification de Masaoka [242], le facteur pronostique le plus significatif sur la survie sans progression et la survie globale des patients [241, 243]. Le caractère pronostique de la classification histologique est lié au fait que les thymomes de type B3 et les carcinomes thymiques sont associées à un stade tumoral au diagnostic plus avancé (stades III-IV) [243-245]. Les indications de la radiothérapie et de la chimiothérapie sont discutées en situation péri-opératoire, mais leur efficacité en situation de récurrence tumorale reste modeste [241], pointant la nécessité de nouvelles approches thérapeutiques.

Les principales données cliniques des tumeurs épithéliales du thymus sont présentées dans l'article (page suivante) : **N. Girard, F. Mornex, P. van Houtte, JF. Cordier, P. van Schil. Thymoma: a focus on current therapeutic management. J Thor Oncol 2009;4:119-26**

I.2. Données biologiques

Peu de données sur la biologie des tumeurs épithéliales du thymus sont disponibles chez l'homme. Les modèles animaux et de cellules primaires ou de lignée ne sont pas nombreux et sont peu accessibles [246]. La plupart des études sur les caractéristiques moléculaires des tumeurs thymiques ont été conduites à l'université de Würzburg/Mannheim, avec la description dans les cellules tumorales, de multiples anomalies cytogénétiques focales et récurrentes observées sur l'ensemble du génome, en particulier des délétions des régions chromosomiques 3p, 6p, 16q, et 17p, et des amplifications des régions 1q, 17q, et 18p. Ces altérations s'accumulent progressivement des thymomes de type A aux thymomes de type B3 et aux carcinomes thymiques [247-251]. Aucune étude n'a cependant étudié le rôle biologique des gènes localisés au sein de ces altérations dans la carcinogenèse thymique.

L'expression du gène suppresseur de tumeur *TP53* est altérée dans 40% à 50% des thymomes et 75% à 100% des carcinomes thymiques [252-254]. Dans les études rapportées,

le niveau d'expression de TP53 semble corrélé au niveau d'invasion tumorale. Des mutations de *TP53* ont rarement été observées [252]. Deux études se sont intéressées à la voie de signalisation p16INK4-RB, qui contrôle la transition G1-S du cycle cellulaire, avec une dérégulation mise en évidence dans 40% à 70% des cas, là encore plus importante en cas de tumeur invasive [254, 255]. D'autres études ont rapporté une méthylation aberrante de gènes suppresseurs de tumeur plus fréquente en cas de carcinome thymique [256], et l'implication de la télomérase, de BCL-2 - un oncogène inhibiteur de l'apoptose -, ou des matrix-métalloprotéases [257-260], toutefois sur des séries de faibles effectifs, utilisant exclusivement les techniques d'immunohistochimie, et non reproduites à ce jour.

Le rôle d'oncogènes spécifiques, en particulier de ceux impliqués dans le développement des cancers broncho-pulmonaires a été suggérée par plusieurs observations cliniques isolées de réponse à des thérapeutiques ciblées spécifiques [261-268]. Ainsi, l'EGFR est surexprimé dans 70% des tumeurs épithéliales du thymus, en particulier en cas de stade avancé, avec la possibilité d'amplification génique associée de l'*EGFR* [269-271]. KIT est un récepteur à activité tyrosine kinase dont la structure et le fonctionnement est similaire à ceux de l'EGFR, et est exprimé spécifiquement dans les carcinomes thymiques [272-274], avec la possibilité de réponse à des inhibiteurs de la tyrosine kinase de KIT comme l'imatinib, le sunitinib ou le sorafenib [263-268].

II. Travail de recherche: étude génomique intégrative des tumeurs épithéliales du thymus

Notre projet s'est intéressé à l'étude génomique intégrative des thymomes et carcinomes thymiques, sur le modèle des travaux effectués dans les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules, avec pour objectifs: 1) d'identifier des mécanismes spécifiques de la carcinogenèse thymique, 2) et en particulier des mutations oncogéniques pouvant être ciblées par des thérapeutiques spécifiques ; 3) d'étudier les différences moléculaires entre sous-types histologiques ; et 4) d'évaluer la valeur pronostique de biomarqueurs tumoraux.

Nous avons collecté 45 échantillons tissulaires congelés de tumeurs épithéliales du thymus opérées au *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*, après accord des différents comités institutionnels (Waiver Number: WA0036-08 et HBUC Number: HBS2008013). Nous avons analysé ces échantillons tumoraux au plan histo-pathologique et immunohistochimique, après construction d'un *tissue micro-array* à partir des blocs de tumeurs correspondantes fixées et incluses en paraffine, pour évaluer l'expression des protéines KIT et EGFR. Nous avons, après extraction de l'ADN tumoral, analysé les profils génomiques de ces tumeurs sur une plateforme de puces d'hybridation génomique comparative (aCGH Agilent 244K), et réalisé un profilage mutationnel pour les gènes suivants: *EGFR*, *KRAS*, *HRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *AKT1*, *ERBB2*, *MEK1*, *TP53*, *KIT*, et *PTEN*. Les échantillons tumoraux ont enfin été analysés sur une plateforme Affymetrix pour les profils d'expression (puces HG-U133A 2.0) après extraction de l'ARN tumoral. Les échantillons collectés correspondaient à 38 thymomes (type A: n=8 ; type B2: n=22 ; type B3: n=8), et 7 carcinomes thymiques.

Nous avons mis en évidence l'existence de mutations activatrices de *KRAS* (G12A et G12V) et de *HRAS* (G13V) dans trois tumeurs (deux thymomes et un carcinome thymique). La présence de telles mutations n'était pas corrélée au niveau d'expression de l'EGFR en immunohistochimie. Trois tumeurs surexprimaient fortement KIT en immunohistochimie, parmi lesquelles deux étaient porteuses de mutations activatrices de *KIT* (mutations V560del et H697Y). Ces mutations étaient mutuellement exclusives avec celles de *RAS*. Leur caractère transformant a été démontré en utilisant des cellules Ba/F3 transfectées par des plasmides porteurs de ces mutations. La prolifération de ces cellules est devenue indépendante de l'IL3, démontrant le caractère oncogénique de ces deux mutations. *In vitro*, la prolifération des cellules porteuses de la mutation V560del était inhibée de façon identique par les inhibiteurs de KIT, imatinib et sunitinib. En revanche, l'inhibition de la prolifération des cellules porteuses de la mutation H697Y nécessitait des concentrations plus élevées d'imatinib, supérieures à celles habituellement utilisées en thérapeutique. Ces cellules étaient sensibles au sunitinib. Ces données fournissent un rationnel pour l'évaluation clinique de thérapies ciblées contre l'EGFR et KIT dans les tumeurs épithéliales du thymus. Aucune autre mutation oncogénique (parmi celles incluses dans notre panel) n'a été identifiée dans notre cohorte d'échantillons.

Les profils génomiques et d'expression ont été analysés par clustering hiérarchique non supervisé, et étaient différents dans les différents groupes histologiques étudiés. Ainsi, l'analyse des profils génomiques a mis en évidence deux groupes principaux, l'un caractérisé par des altérations multiples et étendues du nombre de copies alléliques, et comportant les thymomes de type B3 et les carcinomes thymiques, et l'autre caractérisé par une absence d'aberration chromosomique et comportant les thymomes de type A et de type B2. Les profils génomiques des carcinomes thymiques étaient différents de ceux des carcinomes broncho-

pulmonaires du même type. L'analyse des profils d'expression a montré deux groupes distincts, l'un comportant les thymomes de type B2 et l'autre les thymomes de type A et les carcinomes thymiques. Cette distinction était en fait liée au niveau élevé d'expression des gènes du métabolisme des lymphocytes non tumoraux présents dans les thymomes de type B2.

Au total, nos données de profilage génomique et d'expression représentent une justification de la classification histologique actuelle des tumeurs épithéliales du thymus, et montrent l'existence de sous-groupes moléculaires partageant une signature spécifique. Ces signatures n'apparaissent pas, dans la limite du faible nombre d'échantillons inclus dans notre analyse, comme étant pronostiques sur la survie sans progression ou la survie globale des patients, et n'étaient pas associées spécifiquement aux mutations oncogéniques identifiées.

Nous avons enfin étudié l'expression de l'*Insulin-like Growth Factor-1 Receptor* (IGF-1R) dans notre cohorte de tumeurs thymiques, en utilisant d'une part le *tissue micro-array* de 45 tumeurs précédemment décrit et d'autre part un second *tissue micro-array* de 18 tumeurs, non incluses dans l'étude précédente du fait de la disponibilité uniquement d'échantillons fixés et conservés en paraffine. L'IGF-1R est un récepteur cellulaire à activité tyrosine kinase, dont la structure et le fonctionnement sont similaires à ceux de l'EGFR, et qui est impliqué dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la survie cellulaire [275]. L'IGF-1R est surexprimé dans de nombreux cancers épithéliaux, et est apparu comme une nouvelle cible potentielle pour le développement de thérapies ciblées spécifiques, alors que notre étude des tumeurs thymiques était en cours. Au total, 63 tumeurs épithéliales du thymus, dont 56 thymomes et 7 carcinomes thymiques, ont été analysées. L'IGF-1R était surexprimé dans 86% des carcinomes thymiques et 43% des thymomes. La surexpression de l'IGF-1R était significativement associée à celle de l'EGFR ($p=0.015$). En revanche, le niveau d'expression de l'IGF-1R n'était pas pronostique sur la survie sans progression.

Les résultats de ces analyses sont publiés dans les articles suivants:

- N. Girard, R. Shen, T. Guo, MF. Zakowski, A. Heguy, GJ. Riely, J. Huang, C. Lau, AE. Lash, M. Ladanyi, A. Viale, C. Antonescu, WD. Travis, VW. Rusch, MG. Kris, W. Pao. **Comprehensive genomic analysis reveals clinically relevant molecular distinctions between thymic carcinomas and thymomas.** *Clin Cancer Res* 2009;15:6790-9
- N. Girard, J. Teruya-Feldstein, EC. Payabyab, GJ. Riely, VW. Rusch, MG. Kris, MF. Zakowski. **Insulin-like growth factor-1 receptor expression in thymic malignancies.** *J Thorac Oncol* 2010;5:1439-46

III. Conclusions

Depuis la publication de nos résultats, deux études portant sur les mécanismes de la carcinogenèse des tumeurs thymiques ont été rapportées. La première a été conduite chez 4 patients atteints de carcinome thymique et traités par sunitinib [264]. L'analyse de l'activation de 42 kinases par la technique de *Receptor Tyrosine Kinase array* a montré l'activation d'IGF-1R, de PDGFR- β , de KIT, et de FGRF2 dans les cellules tumorales. Aucune mutation des gènes *KIT*, *KRAS* ou *BRAF* n'a été identifiée.

La seconde étude a été conduite *in vitro* sur des cellules de lignée de carcinome thymique [276]. Ces cellules ont été exposées à des inhibiteurs de HSP90, une protéine chaperonne impliquée la maturation, la stabilisation et l'activation de multiples kinases, dont IGF-1R, CDK4, et les protéines des voies PI3K-AKT et MAPK. Une réduction de la viabilité cellulaire et de l'entrée en apoptose, ainsi qu'un blocage de l'invasion, étaient alors observés. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de IGF-1R reproduisait l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales, ce qui suggèrait un rôle de l'expression de IGF-1R, liée à HSP90, dans l'échappement à l'apoptose et potentiellement la prolifération cellulaire dans les carcinomes thymiques.

Les implications cliniques de nos résultats, en termes prédictifs et pronostiques, ont fait l'objet d'un article de synthèse (page suivante): **N. Girard. Thymic tumors: relevant molecular data in the clinic. J Thorac Oncol 2010;5:S291-5.**

Nos données constituent en effet un rationnel pour le développement clinique d'inhibiteurs ciblés contre certaines altérations moléculaires en cause dans les tumeurs épithéliales du thymus. L'utilisation de telles stratégies repose idéalement sur une sélection des patients sur la base de la présence dans les cellules tumorales, des altérations moléculaires ciblées. Ainsi, pour les carcinomes thymiques, l'analyse des mutations de *KIT* a été incluse dans plusieurs référentiels de prise en charge de ces tumeurs. Depuis notre publication, une large série de 107 tumeurs thymiques évaluées pour l'expression de KIT a été rapportée, et confirme nos données en termes de fréquence et de valeur pronostique de l'expression de KIT [274]. Seules 8 tumeurs ont été génotypées pour *KIT* dans cette étude, sans mutation identifiée. Une nouvelle observation de réponse au sorafenib a également été rapportée chez un patient porteur de carcinome thymique avec une nouvelle mutation de *KIT*, P577-D579del [267]. Collectivement, la fréquence actualisée des mutations de *KIT* dans les carcinomes thymiques est de 6/79 cas, soit 7.6%. La mise en place d'un essai international chez les patients porteurs de carcinome thymique avec mutation de *KIT* est à l'étude. De même, nos données sur l'expression de IGF-1R, couplées à celles de 2 cohortes publiées récemment [276, 277], ont constitué un rationnel biologique pour la mise en place d'un essai thérapeutique de phase II, actuellement en cours, évaluant l'AMG-12, anticorps monoclonal dirigé contre IGF-1R, dans les thymomes et carcinomes thymiques (clinicaltrials.gov ID: NCT00965250). Enfin, un essai ouvert au *National Cancer Institute* américain offre la possibilité de traitement à la carte des tumeurs épithéliales du thymus, par erlotinib en cas de mutation de l'*EGFR*, et par l'inhibiteur de MEK AZD6244 en cas de mutation de *RAF* ou de *RAS* (clinicaltrials.gov ID: NCT01306045). Un site d'information sur les différentes mutations oncogéniques retrouvées dans les carcinomes thymiques et prédictives de la réponse à des thérapeutiques ciblées spécifiques, a été mis en place à l'adresse suivante: <http://www.vicc.org/mycancergenome>.

PERSPECTIVES

Médecine personnalisée en oncologie thoracique

Notre travail a consisté en l'utilisation d'outils de biologie moléculaire pour l'analyse de problématiques cliniques en oncologie thoracique. La problématique du cancer broncho-pulmonaire chez le patient non-fumeur est devenue fréquente en pratique de routine. L'évaluation des polymorphismes génétiques chez ces patients suggère l'implication de gènes spécifiques, différents de ceux participant au métabolisme des carcinogènes du tabac. L'identification de gènes de susceptibilité du cancer broncho-pulmonaire requiert une validation dans plusieurs cohortes indépendantes, comme le montre l'absence d'association dans notre série avec plusieurs polymorphismes précédemment rapportés dans la littérature. La fréquence de la mutation germinale *EGFR* T790M est faible, mais son identification est importante afin de mieux comprendre ses implications en termes de dépistage et de réponse au traitement. Plusieurs études d'association pan-génomiques sont en cours dans les cancers broncho-pulmonaires; une meilleure annotation des caractéristiques cliniques des patients inclus dans ces analyses - histologie, statut mutationnel de la tumeur, stade, survie - pourrait permettre une meilleure interprétation des données et la mise en évidence de nouvelles cibles oncogéniques.

Notre travail sur les cancers broncho-pulmonaires multiples montre la possibilité d'utiliser des biomarqueurs simples, recherchés en routine pour leur valeur prédictive thérapeutique (mutations de l'*EGFR* et de *KRAS*), pour évaluer le degré de clonalité entre des tumeurs multiples. Nos résultats suggèrent un intérêt dans ce contexte de l'analyse histopathologique détaillée, maintenant intégrée à la nouvelle classification histologique IASLC/ATS/ERS des adénocarcinomes broncho-pulmonaires. La validation de nos résultats sur une série indépendante permettrait de proposer l'établissement de nouveaux critères anatomo-cliniques et moléculaires pour différencier cancers broncho-pulmonaires primitifs multiples et cancer broncho-pulmonaire métastatique. Ces critères, remplaçant ceux proposés par Martini et Melamed, pourraient être intégrés dans le système actuel de stadification des cancers broncho-pulmonaires.

Le développement des techniques de profilage moléculaire profite également à l'étude de tumeurs intra-thoraciques plus rares. Notre analyse des tumeurs épithéliales du thymus a montré l'existence de sous-groupes moléculaires spécifiques, caractérisés par des mutations oncogéniques précises potentiellement prédictives de l'efficacité de certains traitements ciblés. Des essais thérapeutiques basés sur ces résultats sont en cours, la sélection des patients sur des critères moléculaires permettant de réduire le nombre de cas nécessaire pour en interpréter les résultats. Les profils génomiques et d'expression montrent la légitimité de la classification histologique actuelle, et constituent une base annotée cliniquement, disponible pour de futures analyses.

Au travers de ces trois problématiques cliniques, nos données illustrent les principes de la médecine personnalisée en oncologie thoracique [279-281]. L'étape décisive de tels projets a été la collecte d'échantillons biologiques de bonne qualité provenant de groupes de patients parfaitement caractérisés sur le plan clinique. Longtemps considérée comme étant éloignée de la pratique clinique de routine, l'utilisation des techniques de caractérisation moléculaire fait aujourd'hui partie intégrante de la prise en charge des cancers broncho-pulmonaires, grâce au développement de méthodes d'analyse plus accessibles en termes de coût et de mise en œuvre. Au-delà de la valeur prédictive thérapeutique des mutations oncogéniques, les biomarqueurs ont une utilité potentielle dans le dépistage, le diagnostic, et la surveillance des tumeurs intra-thoraciques. La prise en charge des patients est alors basée non plus sur le niveau de preuve des interventions proposées, déterminé par l'efficacité d'un traitement sur une population globale, mais sur l'analyse individuelle de caractéristiques moléculaires de la

tumeur ou du patient, permettant un ciblage personnalisé des mécanismes génétiques spécifiquement impliqués dans le développement de la tumeur du patient.

L'implémentation de la médecine personnalisée en routine clinique représente un nouveau paradigme de prise en charge des patients atteints de tumeur intra-thoracique. Comme décrit précédemment, les techniques d'analyse génétique à haut-débit nécessitent de grandes quantités de matériel biologique, de bonne qualité et souvent congelé. Les cliniciens doivent adapter les méthodes de diagnostic pour obtenir de tels échantillons tumoraux. Les techniques et l'analyse des données doivent être standardisées. Les problématiques éthiques doivent être discutées. Au-delà de ces nombreux défis, la médecine personnalisée permettant une individualisation des pratiques médicales à un patient spécifique, constitue une des voies de recherche et de prise en charge les plus prometteuses pour les patients atteints de tumeurs intra-thoraciques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Sasco A. Epidémiologie descriptive des cancers du poumon. *Rev Mal Respir* 1999;16:S44-5
2. Molinie F, Velten M, Remontet L, et al. Progression de l'incidence du cancer du poumon en France (1978-2000). *Rev Mal Respir* 2006;23:127-34
3. Eilstein D, Uhry Z, Cherie-Challine L, Isnard H. Mortalité par cancer du poumon chez les femmes en France. Analyse et tendance de projection de 1975 à 2014. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2005;53:167-81
4. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Harris CC. Pathology and genetics of tumors of the lung, pleura, thymus, and heart. *World Health Organization Classification of Tumours*. Lyon: IARC Press, 2004
5. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2011;6:244-85
6. Christiani DC. Smoking and the molecular epidemiology of lung cancer. *Clin Chest Med* 2000;21:87-93
7. Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006;355:2542-50
8. Yokota J, Kohno T. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci* 2004;95:197-204
9. Jeanmart M, Lantuejoul S, Fievet F, et al. Value of immunohistochemical markers in preinvasive bronchial lesions in risk assessment of lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:2195-2
10. Wistuba II, Mao L, Gazdar AF. Smoking molecular damage in bronchial epithelium. *Oncogene* 2002;21:7298-306
11. Sanz-Ortega J, Roig F, Al-Mousa MM, et al. 17p13 (p53 locus), 5q21 (APC locus) and 9p21 (p16 locus) allelic deletions are frequently found in oral exfoliative cytology cells from smoker patients with non-small-cell lung cancer. *Histol Histopathol* 2007;22:541-5
12. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70
13. Pao W, Miller VA. Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J Clin Oncol* 2005;23:2556-68
14. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 2006;441:424-30
15. Erman M, Grunenwald D, Penault-Llorca F, et al. Epidermal growth factor receptor, HER-2/neu and related pathways in lung adenocarcinomas with bronchioloalveolar features. *Lung Cancer* 2005;47:315-23
16. Hirsch FR, Varella-Garcia M, McCoy J, et al; Southwest Oncology Group. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2005;23:6838-45
17. Rusch V, Klimstra D, Linkov I, et al. Aberrant expression of p53 or the epidermal growth factor receptor is frequent in early bronchial neoplasia and coexpression precedes squamous cell carcinoma development. *Cancer Res* 1995;55:1365-72
18. Tang JM, He QY, Guo RX, et al. Phosphorylated Akt overexpression and loss of PTEN expression in non-small cell lung cancer confers poor prognosis. *Lung Cancer* 2006;51:181-91
19. Miller VA, Johnson DH, Krug LM, et al. Pilot trial of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib plus carboplatin and paclitaxel in patients with stage IIIB or IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:2094-100
20. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA* 2003;290:2149-58
21. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:643-55
22. Miller VA, Kris MG, Shah N, et al. Bronchioloalveolar pathologic subtype and smoking history predict sensitivity to gefitinib in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:1103-9
23. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-500
24. Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:13306-11
25. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129-39
26. Tang X, Shigematsu H, Bekele BN, et al. EGFR tyrosine kinase domain mutations are detected in histologically normal respiratory epithelium in lung cancer patients. *Cancer Res* 2005;65:7568-72
27. Shigematsu H, Gazdar AF. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int J Cancer* 2006;118:257-62
28. Gazdar AF, Shigematsu H, Herz J, et al. Mutations and addiction to EGFR: the Achilles 'heal' of lung cancers? *Trends Mol Med* 2004;10:481-6

29. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 2010;362:2380-8
30. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010; 11:121-8.
31. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:947-57
32. Azzoli CG, Baker S Jr, Temin S, et al. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:6251-6626.
33. Pao W, Wang TY, Riely GJ, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med* 2005;2:e17
34. Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2011;12:175-80
35. Weiss J, Sos M, Seidel D, et al. Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Sci Transl Med* 2010;2:62ra93
36. Ding L, Getz G, Wheeler DA, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 2008;455:1069-75
37. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010;363:1693-703
38. Pao W, Miller VA, Politi KA, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005;2:e73
39. Godin-Heymann N, Bryant I, Rivera MN, et al. Oncogenic activity of epidermal growth factor receptor kinase mutant alleles is enhanced by the T790M drug resistance mutation. *Cancer Res* 2007;67:7319-26
40. Vikis H, Sato M, James M, et al. EGFR-T790M is a rare lung cancer susceptibility allele with enhanced kinase activity. *Cancer Res* 2007;67:4665-70
41. Regales L, Gong Y, Shen R, et al. Dual targeting of EGFR can overcome a major drug resistance mutation in mouse models of EGFR mutant lung cancer. *J Clin Invest* 2009;119:3000-10
42. Eck MJ, Yun CH. Structural and mechanistic underpinnings of the differential drug sensitivity of EGFR mutations in non-small cell lung cancer. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804:559-66
43. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008;359:366-77
44. Ogino A, Kitao H, Hirano S, et al. Emergence of epidermal growth factor receptor T790M mutation during chronic exposure to gefitinib in a non small cell lung cancer cell line. *Cancer Res* 2007;67:7807-14
45. Bean J, Brennan C, Shih JY, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:20932-7
46. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007;316:1039-43
47. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:834-48
48. Ocak S, Sos ML, Thomas RK, Massion PP. High-throughput molecular analysis in lung cancer: insights into biology and potential clinical applications. *Eur Respir J* 2009;34:489-506
49. Thomas RK, Baker AC, Debiasi RM, et al. High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. *Nat Genet* 2007;39:347-51
50. Morozova O, Marra MA. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics* 2008;92:255-64
51. Davies H, Hunter C, Smith R, et al. Somatic mutations of the protein kinase gene family in human lung cancer. *Cancer Res* 2005;65:7591-5
52. Lee W, Jiang Z, Liu J, Haverty PM, et al. The mutation spectrum revealed by paired genome sequences from a lung cancer patient. *Nature* 2010;465:473-7
53. Gabriel S, Ziaugra L, Tabbaa D. SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. *Curr Protoc Hum Genet* 2009; 2:Unit 2.12
54. Su Z, Dias-Santagata D, Duke M, et al. A platform for rapid detection of multiple oncogenic mutations with relevance to targeted therapy in non-small-cell lung cancer. *J Mol Diagn* 2011;13:74-84
55. Lindblad-Toh K, Tanenbaum DM, Daly MJ, et al. Loss-of-heterozygosity analysis of small-cell lung carcinomas using single-nucleotide polymorphism arrays. *Nat Biotechnol* 2000;18:1001-5
56. Tonon G, Wong KK, Maulik G, et al. High-resolution genomic profiles of human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:9625-30
57. Tonon G, Brennan C, Protopopov A, et al. Common and contrasting genomic profiles among the major human lung cancer subtypes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005;70:11-24

58. Jänne PA, Li C, Zhao X, Girard L, et al. High-resolution single-nucleotide polymorphism array and clustering analysis of loss of heterozygosity in human lung cancer cell lines. *Oncogene* 2004;23:2716-26
59. LaFramboise T, Weir BA, Zhao X, et al. Allele-specific amplification in cancer revealed by SNP array analysis. *PLoS Comput Biol* 2005;1:e65
60. Weir BA, Woo MS, Getz G, et al. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature* 2007;450:893-8
61. Esteller M. CpG island methylation and histone modifications: biology and clinical significance. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2006;57:115-26
62. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, et al. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11891-6
63. Nuovo GJ, Plaia TW, Belinsky SA, et al. In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:12754-9
64. Brock MV, Hooker CM, Ota-Machida E, et al. DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *N Engl J Med* 2008;358:1118-28
65. Yan PS, Wei SH, Huang TH. Methylation-specific oligonucleotide microarray. *Methods Mol Biol* 2004;287:251-60
66. Ren B, Robert F, Wyrick JJ, et al. Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science* 2000;290:2306-9
67. Motoi N, Szoke J, Riely GJ, et al. Lung adenocarcinoma: modification of the 2004 WHO mixed subtype to include the major histologic subtype suggests correlations between papillary and micropapillary adenocarcinoma subtypes, EGFR mutations and gene expression analysis. *Am J Surg Pathol* 2008;32:810-27
68. Raponi M, Zhang Y, Yu J, et al. Gene expression signatures for predicting prognosis of squamous cell and adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res* 2006;66:7466-72
69. Takeuchi T, Tomida S, Yatabe Y, et al. Expression profile-defined classification of lung adenocarcinoma shows close relationship with underlying major genetic changes and clinicopathologic behaviors. *J Clin Oncol* 2006;24:1679-88
70. Xiao W, Pacyna-Gengelbach M, Schlüns K, et al. Differentially expressed genes associated with human lung cancer. *Oncol Rep* 2005;14:229-34
71. Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, et al. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:13784-9
72. Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, et al. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:13790-5
73. Hayes DN, Monti S, Parmigiani G, et al. Gene expression profiling reveals reproducible human lung adenocarcinoma subtypes in multiple independent patient cohorts. *J Clin Oncol* 2006;24:5079-90
74. Yatabe Y, Kosaka T, Takahashi T, Mitsudomi T. EGFR mutation is specific for terminal respiratory unit type adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005;29:633-9
75. Beer DG, Kardia SL, Huang CC, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2002;8:816-24
76. Shedden K, Taylor JM, Enkemann SA, et al. Gene expression-based survival prediction in lung adenocarcinoma: a multi-site, blinded validation study. *Nat Med* 2008;14:822-7
77. Shen R, Olshen AB, Ladanyi M. Integrative clustering of multiple genomic data types using a joint latent variable model with application to breast and lung cancer subtype analysis. *Bioinformatics* 2009;25:2906-12
78. Liu CG, Calin GA, Meloon B, et al. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:9740-4
79. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006;9:189-98
80. Liotta LA, Espina V, Mehta AI, et al. Protein microarrays: meeting analytical challenges for clinical applications. *Cancer Cell* 2003;3:317-25
81. Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. *Int J Cancer* 2001;94:1-5
82. Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 2007;131:1190-203
83. Parkin DM, Bray F, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2002;55:74-108
84. Subramanian J, Govindan R. Lung cancer in never smokers: a review. *J Clin Oncol* 2007;25:561-70
85. Toh CK, Gao F, Lim WT, et al. Never smokers with lung cancer: epidemiologic evidence of a distinct disease entity. *J Clin Oncol* 2006;24:2245-51

86. Lee YJ, Kim JH, Kim SK, et al. Lung cancer in never smokers: Change of a mindset in the molecular era. *Lung Cancer* 2011;72:9-15
87. Koo LC, Ho JH. Worldwide epidemiological patterns of lung cancer in nonsmokers. *Int J Epidemiol* 1990 ;9:S14-23
88. Fontham ET, Correa P, Reynolds P, et al. Environmental tobacco smoke and lung cancer in nonsmoking women. A multicenter study. *JAMA* 1994;271:1752-9
89. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71-96
90. Wakelee HA, Chang ET, Gomez SL, et al. Lung cancer incidence in never smokers. *J Clin Oncol* 2007;25:472-8
91. Weekly M. Annual smoking-attributable mortality, years of potential life lost, and productivity losses -- United States 1997-2001. *MMWR Weekly* 2005;54:625-8
92. Toh CK, Lim WT. Lung cancer in never smokers. *J Clin Pathol* 2007;60:337-40
93. Kurahashi N, Inoue M, Liu Y, et al. Passive smoking and lung cancer in Japanese non-smoking women: a prospective study. *Int J Cancer* 2008;122:653-7
94. Epidemiology of lung cancer. In: American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures*. 2007. Atlanta, GA: American Cancer Society. 2007
95. Thun MJ, Henley SJ, Burns D, et al. Lung cancer death rates in lifelong nonsmokers. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:691-9
96. Janjijian Y, Lee W, Kris MG, et al. Pack years of cigarette smoking as a prognostic factor in patients with stage IIIB/IV non small cell lung cancer. *Cancer* 2010;116:670-5
97. Nordquist LT, Simon GR, Cantor A, et al. Improved survival in never smokers vs current smokers with primary adenocarcinoma of the lung. *Chest* 2004;126:347-51
98. Brennan P, Buffler PA, Reynolds P, et al. Secondhand smoke exposure in adulthood and risk of lung cancer among never smokers: a pooled analysis of two large studies. *Int J Cancer* 2004;109:125-31
99. Darby S, Hill D, Auvinen A, et al. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ* 2005;330:223
100. Krewski D, Lubin JH, Zielinski JM, et al. A combined analysis of North American case-control studies of residential radon and lung cancer. *J Toxicol Environ Health A* 2006; 69:533-97
101. Gorlova OY, Zhang Y, Schabath MB, et al. Never smokers and lung cancer risk: a case-control study of epidemiological factors. *Int J Cancer* 2006 ;118:1798-1804
102. Ko YC, Cheng LS, Lee CH, et al. Chinese food cooking and lung cancer in women nonsmokers. *Am J Epidemiol* 2000;151:140-7
103. Wu-Williams AH, Dai XD, Blot W, et al. Lung cancer among women in north-east China. *Br J Cancer* 1990 ;62:982-7
104. Brennan P, Fortes C, Butler J, et al. A multicenter case-control study of diet and lung cancer among non-smokers. *Cancer Causes Control* 2000;11:49-58
105. Mayne ST, Buenconsejo J, Janerich DT. Previous lung disease and risk of lung cancer among men and women nonsmokers. *Am J Epidemiol* 1999;149:13-20
106. Cheng Y, Chiou H, Sheu G, et al. The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. *Cancer Res* 2001;61:2799-803
107. Leroux C, Girard N, Cottin V, et al. Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV): from virus to lung cancer in sheep. *Vet Res* 2007;38:211-28
108. Shigematsu H, Nomura M, Suzuki M, et al. Gene mutation differences in lung cancers arising in never and ever smokers. 2005 Proc AACR LB-39.
109. Sonobe M, Manabe T, Wada H, Tanaka F. Lung adenocarcinoma harboring mutations in the ERBB2 kinase domain. *J Mol Diagn* 2006;8:351-6
110. Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, et al. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:5731-4
111. Gealy R, Zhang L, Siegfried JM, et al. Comparison of mutations in the p53 and K-ras genes in lung carcinomas from smoking and nonsmoking women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:297-302
112. Matakidou A, Eisen T, Bridle H, et al. Case-control study of familial lung cancer risks in UK women. *Int J Cancer* 2005;116:445-50
113. Xu H, Spitz MR, Amos CI, Shete S. Complex segregation analysis reveals a multigene model for lung cancer. *Hum Genet* 2005;116:121-7
114. Bailey-Wilson JE, Amos CI, Pinney SM, et al. A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25. *Am J Hum Genet* 2004;75:460-74
115. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer* 2005;93:825-33
116. Manichaikul A, Mychaleckyj JC, Rich SS, et al. Robust relationship inference in genome-wide association studies. *Bioinformatics* 2010;26:2867-73

117. Yang H, Spitz MR, Stewart DJ, et al. ATM sequence variants associate with susceptibility to non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2007;121:2254-9
118. Shi X, Zhou S, Wang Z, et al. CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and lung cancer risk in Chinese populations: a meta-analysis. *Lung Cancer* 2008;59:155-63
119. Kiyohara C, Wakai K, Mikami H, et al. Risk modification by CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms in the association of environmental tobacco smoke and lung cancer: a case-control study in Japanese nonsmoking women. *Int J Cancer* 2003;107:139-44
120. Raimondi S, Boffetta P, Anttila S, et al. Metabolic gene polymorphisms and lung cancer risk in non-smokers. An update of the GSEC study. *Mutat Res* 2005;592:45-57
121. Yin J, Li J, Ma Y, et al. The DNA repair gene ERCC2/XPD polymorphism Arg 156Arg (A22541C) and risk of lung cancer in a Chinese population. *Cancer Lett* 2005;223:219-26
122. Benhamou S, Lee WJ, Alexandrie AK, et al. Meta- and pooled analyses of the effects of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and smoking on lung cancer risk. *Carcinogenesis* 2002;23:1343-50
123. Li G, Zhai X, Zhang Z, et al. MDM2 gene promoter polymorphisms and risk of lung cancer: a case-control analysis. *Carcinogenesis* 2006;27:2028-33
124. Kiyohara C, Yoshimasu K, Takayama K, Nakanishi Y. NQO1, MPO, and the risk of lung cancer: a HuGE review. *Genet Med* 2005;7:463-78
125. Yin J, Vogel U, Ma Y, et al. The DNA repair gene XRCC1 and genetic susceptibility of lung cancer in a northeastern Chinese population. *Lung Cancer* 2007;56:153-60
126. Divine KK, Gilliland FD, Crowell RE, et al. The XRCC1 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung. *Mutat Res* 2001;461:273-8
127. Gunderson KL, Steemers FJ, Lee G, et al. A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. *Nat Genet* 2005;37:549-54
128. Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, et al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature* 2008;452:633-7
129. Amos CI, Wu X, Broderick P, et al. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet* 2008;40:616-22
130. Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, et al. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature* 2008;452:638-42
131. Arredondo J, Chernyavsky AI, Jolkovsky DL, et al. Receptor-mediated tobacco toxicity: acceleration of sequential expression of alpha5 and alpha7 nicotinic receptor subunits in oral keratinocytes exposed to cigarette smoke. *FASEB J* 2008;22:1356-68
132. Wang J, Spitz MR, Amos CI, et al. Mediating effects of smoking and chronic obstructive pulmonary disease on the relation between the CHRNA5-A3 genetic locus and lung cancer risk. *Cancer* 2010;116:3458-62
133. Lambrechts D, Buyschaert I, Zanen P, et al. The 15q24/25 susceptibility variant for lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease is associated with emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:486-93
134. Le Marchand L, Derby KS, Murphy SE, et al. Smokers with the CHRNA lung cancer-associated variants are exposed to higher levels of nicotine equivalents and a carcinogenic tobacco-specific nitrosamine. *Cancer Res* 2008;68:9137-40
135. Saccone NL, Culverhouse RC, Schwantes-An TH, et al. Multiple independent loci at chromosome 15q25.1 affect smoking quantity: a meta-analysis and comparison with lung cancer and COPD. *PLoS Genet* 2010;6:e1001053
136. Jou YS, Lo YL, Hsiao CF, et al. Association of an EGFR intron 1 SNP with never-smoking female lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer* 2009;64:251-6
137. Bell DW, Gore I, Okimoto RA, et al. Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. *2005 Nat Genet* 37:1315-6
138. Vikis H, Sato M, James M, et al. EGFR-T790M is a rare lung cancer susceptibility allele with enhanced kinase activity. *2007 Cancer Res* 67:4665-70
139. Prudkin L, Tang X, Wistuba II. Germ-line and somatic presentations of the EGFR T790M mutation in lung cancer. *2009 J Thorac Oncol* 4:139-141
140. Stadler ZK, Thom P, Robson ME, et al. Genome-wide association studies of cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:4255-67
141. Truong T, Hung RJ, Amos CI, et al. Replication of lung cancer susceptibility loci at chromosomes 15q25, 5p15, and 6p21: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:959-71
142. Lips EH, Gaborieau V, McKay JD, et al. Association between a 15q25 gene variant, smoking quantity and tobacco-related cancers among 17 000 individuals. *Int J Epidemiol* 2010;39:563-77

143. Wu C, Hu Z, Yu D, Huang L, et al. Genetic variants on chromosome 15q25 associated with lung cancer risk in Chinese populations. *Cancer Res* 2009;69:5065-72
144. McKay JD, Hung RJ, Gaborieau V, et al. Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33. *Nat Genet* 2008;40:1404-6
145. Landi MT, Chatterjee N, Yu K, et al. A genome-wide association study of lung cancer identifies a region of chromosome 5p15 associated with risk for adenocarcinoma. *Am J Hum Genet* 2009;85:679-91
146. Hsiung CA, Lan Q, Hong YC, et al. The 5p15.33 locus is associated with risk of lung adenocarcinoma in never-smoking females in Asia. *PLoS Genet* 2010;6: e1001051
147. Wang Y, Broderick P, Matakidou A, et al. Role of 5p15.33 (TERT-CLPTM1L), 6p21.33 and 15q25.1 (CHRNA5-CHRNA3) variation and lung cancer risk in never-smokers. *Carcinogenesis* 2010;31:234-8
148. Miki D, Kubo M, Takahashi A, et al. Variation in TP63 is associated with lung adenocarcinoma susceptibility in Japanese and Korean populations. *Nat Genet* 2010;42:893-6
149. Lim WY, Chen Y, Ali SM, et al. Polymorphisms in inflammatory pathway genes, host factors, and lung cancer risk in Chinese female never-smokers. *Carcinogenesis* 2011; 32:522-9
150. Wei S, Niu J, Zhao H, Liu Z, et al. Association of a novel functional promoter variant (rs2075533 C>T) in the apoptosis gene TNFSF8 with risk of lung cancer - a finding from Texas lung cancer genome-wide association study. *Carcinogenesis* 2011; 32:507-15
151. Hung RJ, Christiani DC, Risch A, et al. International Lung Cancer Consortium: pooled analysis of sequence variants in DNA repair and cell cycle pathways. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:3081-9
152. Lo YL, Hsiao CF, Jou YS, et al. ATM polymorphisms and risk of lung cancer among never smokers. *Lung Cancer* 2010;69:148-54
153. Li Y, Sheu CC, Ye Y, de Andrade M, et al. Genetic variants and risk of lung cancer in never smokers: a genome-wide association study. *Lancet Oncol* 2010;11:321-30
154. Miller VA, Riely GJ, Zakowski MF, et al. Molecular characteristics of bronchioloalveolar carcinoma and adenocarcinoma, bronchioloalveolar carcinoma subtype, predict response to erlotinib. *J Clin Oncol* 2008;26:1472-8
155. Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, et al. Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. *Clin Cancer Res* 2009;15:5216-23
156. Terasaki H, Niki T, Matsuno Y, et al. Lung adenocarcinoma with mixed bronchioloalveolar and invasive components: clinicopathological features, subclassification by extent of invasive foci, and immunohistochemical characterization. *Am J Surg Pathol* 2003;27:937-51
157. Yokose T, Suzuki K, Nagai K, et al. Favorable and unfavorable morphological prognostic factors in peripheral adenocarcinoma of the lung 3 cm or less in diameter. *Lung Cancer* 2000;29:179-88
158. Sakurai H, Dobashi Y, Mizutani E, et al. Bronchioloalveolar carcinoma of the lung 3 centimeters or less in diameter: a prognostic assessment. *Ann Thorac Surg* 2004;78:1728-33
159. Miyoshi T, Satoh Y, Okumura S, et al. Early-stage lung adenocarcinomas with a micropapillary pattern, a distinct pathologic marker for a significantly poor prognosis. *Am J Surg Pathol* 2003;27:101-9
160. Moro-Sibilot D, Lantuejoul S, Diab S, et al. Lung carcinomas with a basaloid pattern: a study of 90 cases focusing on their poor prognosis. *Eur Respir J* 2008;31:854-9
161. Taniguchi K, Okami J, Kodama K, et al. Intratumor heterogeneity of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer and its correlation to the response to gefitinib. *Cancer Sci* 2008;99:929-35
162. Sakurada A, Lara-Guerra H, Liu N, et al. Tissue heterogeneity of EGFR mutation in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2008;3:527-9
163. Nakano H, Soda H, Nakamura Y, et al. Different epidermal growth factor receptor gene mutations in a patient with 2 synchronous lung cancers. *Clin Lung Cancer* 2007;8:562-4
164. Kohno T, Kunitoh H, Suzuki K, et al. Association of KRAS polymorphisms with risk for lung adenocarcinoma accompanied by atypical adenomatous hyperplasias. *Carcinogenesis* 2008;29:957-63
165. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953;6:963-8
166. Braakhuis BJ, Tabor MP, Leemans CR, et al. Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck* 2002;24:198-206
167. Braakhuis BJ, Brakenhoff RH, Leemans CR. Second field tumors: a new opportunity for cancer prevention? *Oncologist* 2005;10:493-500
168. Yoshida Y, Shibata T, Kokubu A, et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in atypical adenomatous hyperplasia and bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2005;50:1-8
169. Ikeda K, Nomori H, Ohba Y, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in multicentric lung adenocarcinomas and atypical adenomatous hyperplasias. *J Thorac Oncol* 2008;3:467-71
170. Debois JM. Txnmx1: The Anatomy and Clinics of Metastatic Cancer. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherland.

171. Adebonojo SA, Moritz DM, Danby CA. The results of modern surgical therapy for multiple primary lung cancers. *Chest* 1997;112:693-701
172. Rice D, Kim HW, Sabichi A, et al. The risk of second primary tumors after resection of stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2003;76:1001-7
173. Vazquez M, Carter D, Brambilla E, et al. Solitary and multiple resected adenocarcinomas after CT screening for lung cancer: Histopathologic features and their prognostic implications. *Lung Cancer* 2009;64:148-54
174. Oliaro A, Filosso PL, Cavallo A, et al. The significance of intrapulmonary metastasis in non-small cell lung cancer: upstaging or downstaging? A re-appraisal for the next TNM staging system. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008;34:438-43
175. van Rens MT, Zanen P, Brutel de La Riviere A, Elbers HR, van Swieten HA, van Den Bosch JM. Survival in synchronous vs. single lung cancer: upstaging better reflects prognosis. *Chest* 2000;118:952-8
176. Rami-Porta R, Ball D, Crowley J, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the T descriptors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007;2:593-602
177. Postmus PE, Brambilla E, Chansky K, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for revision of the M descriptors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007;2:686-93
178. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2007;2:706-14
179. Martini N, Melamed MR. Multiple primary lung cancers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1975;70:606-12
180. Martini N, Bains MS, Burt ME, et al. Incidence of local recurrence and second primary tumors in resected stage I lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;109:120-9
181. Pairolo PC, Williams DE, Bergstralh EJ, et al. Postsurgical stage I bronchogenic carcinoma: morbid implications of recurrent disease. *Ann Thorac Surg* 1984;38:331-8
182. Shen KR, Meyers BF, Lerner JM, Jones DR; American College of Chest Physicians. Special treatment issues in lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007;132:290S-305S
183. Riquet M, Cazes A, Pfeuty K, et al. Multiple lung cancers prognosis: what about histology? *Ann Thorac Surg* 2008;86:921-6
184. Mathisen DJ, Jensik RJ, Faber LP, Kittle CF. Survival following resection for second and third primary lung cancers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1984;88:502-10
185. Wu SC, Lin ZQ, Xu CW, et al. Multiple primary lung cancers. *Chest* 1987;92:892-6
186. Ferguson MK, DeMeester TR, DesLauriers J, et al. Diagnosis and management of synchronous lung cancers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1985;89:378-85
187. Deschamps C, Pairolo PC, Trastek VF, Payne WS. Multiple primary lung cancers. Results of surgical treatment. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990;99:769-77
188. Rosengart TK, Martini N, Ghosn P, Burt M. Multiple primary lung carcinomas: prognosis and treatment. *Ann Thorac Surg* 1991;52:773-8
189. Verhagen AF, Tavilla G, van de Wal HJ, et al. Multiple primary lung cancers. *Thorac Cardiovasc Surg* 1994;42:40-4
190. Ribet M, Dambron P. Multiple primary lung cancers. *Eur J Cardiothorac Surg* 1995;9:231-6
191. Angeletti CA, Mussi A, Janni A, et al. Second primary lung cancer and relapse: treatment and follow-up. *Eur J Cardiothorac Surg* 1995;9:607-11
192. Antakli T, Schaefer RF, Rutherford JE, Read RC. Second primary lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1995;59:863-6
193. Okada M, Tsubota N, Yoshimura M, Miyamoto Y. Operative approach for multiple primary lung carcinomas. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115:836-40
194. Rea F, Zuin A, Callegaro D, et al. Surgical results for multiple primary lung cancers. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001;20:489-95
195. Aziz TM, Saad RA, Glasser J, et al. The management of second primary lung cancers. A single centre experience in 15 years. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;21:527-33
196. Nakata M, Sawada S, Yamashita M, et al. Surgical treatments for multiple primary adenocarcinoma of the lung. *Ann Thorac Surg* 2004;78:1194-9
197. Tsunozuka Y, Matsumoto I, Tamura M, et al. The results of therapy for bilateral multiple primary lung cancers: 30 years experience in a single centre. *Eur J Surg Oncol* 2004;30:781-5
198. Chang YL, Wu CT, Lee YC. Surgical treatment of synchronous multiple primary lung cancers: experience of 92 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;134:630-7

199. Trousse D, Barlesi F, Loundou A, et al. Synchronous multiple primary lung cancer: an increasing clinical occurrence requiring multidisciplinary management. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;133:193-200
200. Rostad H, Strand TE, Naalsund A, Norstein J. Resected synchronous primary malignant lung tumors: a population-based study. *Ann Thorac Surg* 2008;85:204-9
201. Voltolini L, Rapicetta C, Luzzi L, et al. Surgical treatment of synchronous multiple lung cancer located in a different lobe or lung: high survival in node-negative subgroup. *Eur J Cardiothorac Surg* 2010;37:1198-204
202. Jung EJ, Lee JH, Jeon K, et al. Treatment outcomes for patients with synchronous multiple primary non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2011; doi:10.1016/j.lungcan.2010.11.008
203. Finley DJ, Yoshizawa A, Travis W, et al. Predictors of outcomes after surgical treatment of synchronous primary lung cancers. *J Thorac Oncol* 2010;5:197-205
204. Mousset X, Deslauriers J, Beaulieu M, et al. [Multiple primary lung cancers. The importance of early diagnosis and survival after a new surgical excision] *Ann Chir* 1989;43:658-62
205. Wassmer FA, Racloz Y, Megevand R. [Multiple metachronous lung tumors. Metastases or second primary tumor] *Ann Chir* 1991;45:163-6
206. van Meerbeeck J, Weyler J, Thibaut A, et al. Second primary lung cancer in Flanders: frequency, clinical presentation, treatment and prognosis. *Lung Cancer* 1996;15:281-95
207. Hishida T, Nagai K, Yoshida J, et al. Is surgical resection indicated for a solitary non-small cell lung cancer recurrence? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;131:838-42
208. Lau DH, Yang B, Hu R, Benfield JR. Clonal origin of multiple lung cancers: K-ras and p53 mutations determined by nonradioisotopic single-strand conformation polymorphism analysis. *Diagn Mol Pathol* 1997;6:179-84
209. Ichinose Y, Hara N, Ohta M. Synchronous lung cancers defined by deoxyribonucleic acid flow cytometry. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991;102:418-24
210. Tang M, Pires Y, Schultz M, et al. Microsatellite analysis of synchronous and metachronous tumors: a tool for double primary tumor and metastasis assessment. *Diagn Mol Pathol* 2003;12:151-9
211. Dacic S, Ionescu DN, Finkelstein S, Yousem SA. Patterns of allelic loss of synchronous adenocarcinomas of the lung. *Am J Surg Pathol* 2005;29:897-902
212. Ryoo BY, Na II, Yang SH, et al. Synchronous multiple primary lung cancers with different response to gefitinib. *Lung Cancer* 2006;53:245-8
213. Chang YL, Wu CT, Lin SC, et al. Clonality and prognostic implications of p53 and epidermal growth factor receptor somatic aberrations in multiple primary lung cancers. *Clin Cancer Res* 2007;13:52-8
214. Mitsudomi T, Yatabe Y, Koshikawa T, et al. Mutations of the P53 tumor suppressor gene as clonal marker for multiple primary lung cancers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;114:354-60
215. Hiroshima K, Toyozaki T, Kohno H, et al. Synchronous and metachronous lung carcinomas: molecular evidence for multicentricity. *Pathol Int* 1998;48:869-76
216. Wang X, Christiani DC, Mark EJ, et al. Carcinogen exposure, p53 alteration, and K-ras mutation in synchronous multiple primary lung carcinoma. *Cancer* 1999;85:1734-9
217. Matsuzoe D, Hideshima T, Ohshima K, et al. Discrimination of double primary lung cancer from intrapulmonary metastasis by p53 gene mutation. *Br J Cancer* 1999;79:1549-52
218. Shimizu S, Yatabe Y, Koshikawa T, et al. High frequency of clonally related tumors in cases of multiple synchronous lung cancers as revealed by molecular diagnosis. *Clin Cancer Res* 2000;6:3994-9
219. Holst VA, Finkelstein S, Yousem SA. Bronchioloalveolar adenocarcinoma of lung: monoclonal origin for multifocal disease. *Am J Surg Pathol* 1998;22:1343-50.
220. Shin SW, Breathnach OS, Linnoila RI, et al. Genetic changes in contralateral bronchioloalveolar carcinomas of the lung. *Oncology* 2001;60:81-7
221. Huang J, Behrens C, Wistuba I, et al. Molecular analysis of synchronous and metachronous tumors of the lung: impact on management and prognosis. *Ann Diagn Pathol* 2001;5:321-9
222. van Rens MT, Eijken EJ, Elbers JR, et al. p53 mutation analysis for definite diagnosis of multiple primary lung carcinoma. *Cancer* 2002;94:188-96
223. Gallegos Ruiz MI, van Crujisen H, Smit EF, et al. Genetic heterogeneity in patients with multiple neoplastic lung lesions: a report of three cases. *J Thoracic Oncol* 2007;2:12-21
224. Wang X, Wang M, MacLennan GT, et al. Evidence for common clonal origin of multifocal lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:560-70
225. Venkatraman ES, Mitra N, Begg CB. A method for evaluating the impact of individual haplotypes on disease incidence in molecular epidemiology studies. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004;3:Article27
226. Begg CB, Eng KH, Hummer AJ. Statistical tests for clonality. *Biometrics* 2007;63:522-30
227. Ostrovskaya I, Seshan VE, Begg CB. Comparison of Properties of Tests for Assessing Tumor Clonality. *Biometrics* 2008; 64:1018-22

228. Ostrovnyaya I, Olshen AB, Seshan VE, et al. A metastasis or a second independent cancer? Evaluating the clonal origin of tumors using array copy number data. *Stat Med* 2010;29:1608-21
229. Ostrovnyaya I, Begg CB. Testing clonal relatedness of tumors using array comparative genomic hybridization: a statistical challenge. *Clin Cancer Res* 2010;16:1358-67
230. Jones S, Chen WD, Parmigiani G, et al. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:4283-8
231. Franklin WA, Gazdar AF, Haney J, et al. Widely dispersed p53 mutation in respiratory epithelium. *J Clin Invest* 1997;100:2133-7
232. Udagawa T. Tumor dormancy of primary and secondary cancers. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 2008;116:615-28
233. Naumov GN, Folkman J, Straume O. Tumor dormancy due to failure of angiogenesis: role of the microenvironment. *Clin Exp Metastasis* 2009;26:51-60
234. Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell* 2009;139:1315-26
235. Zudaire I, Lozano MD, Vazquez MF, et al. Molecular characterization of small peripheral lung tumors based on the analysis of fine needle aspirates. *Histol Histopathol* 2008;23:33-40
236. Otani H, Toyooka S, Soh J, et al. Detection of EGFR gene mutations using the wash fluid of CT-guided biopsy needle in NSCLC patients. *J Thorac Oncol* 2008;3:472-6
237. Shih JY, Gow CH, Yu CJ, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in needle biopsy/aspiration samples predict response to gefitinib therapy and survival of patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* 2006;118:963-9
238. de Jong WK, Blaauwgeers JL, Schaapveld M, et al. Thymic epithelial tumours: a population-based study of the incidence, diagnostic procedures and therapy. *Eur J Cancer* 2008; 44:123-130
239. Marx A, Muller-Hermelinck HK. From basic immunobiology to the upcoming WHO-classification of tumors of the thymus. The second conference on Biological and Clinical Aspects of thymic epithelial tumors and related recent developments. *Pathol Res Pract* 1999;195:515-33
240. Eng TY, Fuller CD, Jagirdar J, et al. Thymic carcinoma: state of the art review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59:654-64
241. Girard N, Mornex F, Van Houtte P, et al. Thymoma: a focus on current therapeutic management. *J Thorac Oncol* 2009;4:119-26
242. Masaoka A, Monden Y, Nakahara K, Tanioka T. Follow-up study of thymomas with special reference to their clinical stages. *Cancer* 1981;48:2485-92
243. Kondo K, Monden Y. Therapy for thymic epithelial tumors: a clinical study of 1,320 patients from Japan. *Ann Thorac Surg* 2003;76:878-84
244. Chalabreysse L, Roy P, Cordier JF, et al. Correlation of the WHO schema for the classification of thymic epithelial neoplasms with prognosis: a retrospective study of 90 tumors. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1605-11
245. Okumura M, Miyoshi S, Fujii Y, et al. Clinical and functional significance of WHO classification on human thymic epithelial neoplasms: a study of 146 consecutive tumours. *Am J Surg Pathol* 2001;25:103-10
246. Ehemann V, Kern MA, Breinig M, et al. Establishment, characterization and drug sensitivity testing in primary cultures of human thymoma and thymic carcinoma. *Int J Cancer* 2008;122:2719-25
247. Penzel R, Hoegel J, Schmitz W, et al. Clusters of chromosomal imbalances in thymic epithelial tumours are associated with the WHO classification and the staging system according to Masaoka. *Int J Cancer* 2003;105:494-8
248. Inoue M, Starostik P, Zettl A, et al. Correlating genetic aberrations with World Health Organization-defined histology and stage across the spectrum of thymomas. *Cancer Res* 2003;63:3708-15
249. Zhou R, Zettl A, Ströbel P, et al. Thymic epithelial tumours can develop along two different pathogenetic pathways. *Am J Pathol* 2001;159:1853-60
250. Lee GY, Yang WI, Jeung HC, et al. Genome-wide genetic aberrations of thymoma using cDNA microarray based comparative genomic hybridization. *BMC Genomics* 2007;8:305
251. Zettl A, Ströbel P, Wagner K, et al. Recurrent genetic aberrations in thymoma and thymic carcinoma. *Am J Pathol* 2000;157:257
252. Puglisi F. p53 protein expression and p53 mutation in thymic epithelial tumors. *Am J Clin Pathol* 1996;105:657-8274
253. Pan CC, Chen PC, Wang LS, et al. Expression of apoptosis-related markers and HER-2/neu in thymic epithelial tumours. *Histopathology* 2003;43:165-72
254. Pich A, Chiarle R, Chiusa L, et al. p53 expression and proliferative activity predict survival in non-invasive thymomas. *Int J Cancer* 1996;69:180-3
255. Hirabayashi H, Fujii Y, Sakaguchi M, et al. p16INK4, pRB, p53 and cyclin D1 expression and hypermethylation of CDKN2 gene in thymoma and thymic carcinoma. *Int J Cancer* 1997;73:639-44

256. Suzuki M, Chen H, Shigematsu H, et al. Aberrant methylation: common in thymic carcinomas, rare in thymomas. *Oncol Rep* 2005;14:1621-4
257. Sogawa K, Kondo K, Fujino H, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 is correlated with poor prognostic variables in patients with thymic epithelial tumors. *Cancer* 2003;98:1822-9
258. Engel P, Francis D, Graem N. Expression of bcl-2 in fetal thymus, thymomas and thymic carcinomas. Association with p53 expression and review of the literature. *APMIS* 1998;106:449-55
259. Stefanaki K, Rontogianni D, Kouvidou CH, et al. Expression of p53, mdm2, p21/waf1 and bcl-2 proteins in thymomas. *Histopathology* 1997;30:549-55
260. Chen FF, Yan JJ, Jin YT, Su IJ. Detection of bcl-2 and p53 in thymoma: expression of bcl-2 as a reliable marker of tumor aggressiveness. *Hum Pathol* 1996;27:1089-92
261. Christodoulou C, Murray S, Dahabreh J, et al. Response of malignant thymoma to erlotinib. *Ann Oncol* 2008;19:1361-2
262. Bedano PM, Perkins S, Burns M, et al. A phase II trial of erlotinib plus bevacizumab in patients with recurrent thymoma or thymic carcinoma. *J Clin Oncol* 26;2008 (abstr 19087)
263. Ströbel P, Hartmann M, Jakob A, et al. Thymic carcinoma with overexpression of mutated KIT and the response to imatinib. *N Engl J Med* 2004;350:2625-6
264. Ströbel P, Bargou R, Wolff A, et al. Sunitinib in metastatic thymic carcinomas: laboratory findings and initial clinical experience. *Br J Cancer* 2010;103:196-200
265. Bisagni G, Rossi G, Cavazza A, et al. Long lasting response to the multikinase inhibitor bay 43-9006 (Sorafenib) in a heavily pretreated metastatic thymic carcinoma. *J Thorac Oncol* 2009;4:773-5
266. Chuah C, Lim TH, Lim AS, et al. Dasatinib induces a response in malignant thymoma. *J Clin Oncol* 2006;24:e56-8
267. Dişel U, Oztuzcu S, Beşen AA, et al. Promising efficacy of sorafenib in a relapsed thymic carcinoma with C-KIT exon 11 deletion mutation. *Lung Cancer* 2011;71:109-12
268. Fiedler W, Giaccone G, Lasch P, et al. Phase I trial of SU14813 in patients with advanced solid malignancies. *Ann Oncol* 2011;22:195-201
269. Henley JD, Koukoulis GK, Loehrer PJ Sr. Epidermal growth factor receptor expression in invasive thymoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:167-70
270. Aisner SC, Dahlberg S, Hameed MR, et al. Epidermal Growth Factor Receptor, C-kit, and Her2/neu Immunostaining in Advanced or Recurrent Thymic Epithelial Neoplasms Staged According to the 2004 World Health Organization in Patients Treated with Octreotide and Prednisone: An Eastern Cooperative Oncology Group Study. *J Thoracic Oncol* 2010;5:885-92
271. Ionescu DN, Sasatomi E, Ciepły K, et al. Protein expression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in thymomas. *Cancer* 2005;103:630-6
272. Pan CC, Chen PC, Chiang H. KIT (CD117) is frequently overexpressed in thymic carcinomas but is absent in thymomas. *J Pathol* 2004;202:375-81
273. Nakagawa K, Matsuno Y, Kunitoh H, et al. Immunohistochemical KIT (CD117) expression in thymic epithelial tumors. *Chest* 2005;128:140-4
274. Petrini I, Zucali PA, Lee HS, et al. Expression and mutational status of c-kit in thymic epithelial tumors. *J Thorac Oncol* 2010;5:1447-53
275. Chitnis MM, Yuen JS, Protheroe AS, et al. The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clin Cancer Res* 2008;14:6364-70
276. Breinig M, Mayer P, Harjung A, et al. Heat shock protein 90-sheltered overexpression of insulin-like growth factor 1 receptor contributes to malignancy of thymic epithelial tumors. *Clin Cancer Res* 2011; doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1689
277. Zucali PA, Petrini I, Lorenzi E, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor and phosphorylated AKT-serine 473 expression in 132 resected thymomas and thymic carcinomas. *Cancer* 2010;116:4686-95
278. Diamandis M, White NM, Yousef GM. Personalized medicine: marking a new epoch in cancer patient management. *Mol Cancer Res* 2010;8:1175-87
279. Gonzalez-Angulo AM, Hennessy BT, Mills GB. Future of personalized medicine in oncology: a systems biology approach. *J Clin Oncol* 2010;28:2777-83
280. Bottinger EP. Foundations, promises and uncertainties of personalized medicine. *Mt Sinai J Med* 2007;74:15-21
281. Meyer JM, Ginsburg GS. The path to personalized medicine. *Curr Opin Chem Biol* 2002;6:434-8

