



Le cancer broncho-pulmonaire du non-fumeur : un modèle pour le diagnostic non-invasif des biomarqueurs tumoraux et l'évaluation de leurs interactions avec l'exposition aux facteurs de risque

Sébastien Couraud

► To cite this version:

Sébastien Couraud. Le cancer broncho-pulmonaire du non-fumeur : un modèle pour le diagnostic non-invasif des biomarqueurs tumoraux et l'évaluation de leurs interactions avec l'exposition aux facteurs de risque. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. ⟨NNT : 2015LYO10007⟩. ⟨tel-01163211⟩

HAL Id: tel-01163211

<https://theses.hal.science/tel-01163211v1>

Submitted on 12 Jun 2015

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.



HAL Authorization

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 3 février 2015

par

Sébastien Couraud

N°07-2015

Le cancer broncho-pulmonaire du non-fumeur : un modèle pour le diagnostic non-invasif des biomarqueurs tumoraux et l'évaluation de leurs interactions avec l'exposition aux facteurs de risque de cancer.

Directeur de thèse: Monsieur le Professeur Jean-François MORNEX.

COMPOSITION DU JURY

Président du Jury :	Monsieur le Professeur Gérard Zalcman
Rapporteur :	Monsieur le Professeur Fabrice Barlési
Rapporteur :	Monsieur le Docteur Philippe Lassalle
Membre du Jury :	Monsieur le Professeur Jean-François Mornex
Membre du Jury :	Madame le Docteur Magali Olivier

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

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

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

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 : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

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 : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

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. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

A Céline,

A Martin et Camille

A mes collègues Emilie, Lisa, Laurence, Nathalie, Myriam, et Pierre-Jean, grâce à qui je peux « faire semblant de travailler dans mon bureau » pendant qu'ils assurent au front ! Ce travail est aussi le vôtre. Merci.

Ce travail est dédié à la mémoire de Viviane Victorin.

Aux membres du Jury

Monsieur le Professeur Gérard Zalcman,

Ton enthousiasme et ta passion pour l'oncologie thoracique a été contagieux depuis Caen ! Je te remercie pour la confiance que tu m'as constamment témoignée depuis des années. Merci aussi pour ta franchise (que je partage avec toi !). Bonne route pour tes nouveaux projets (dont certains sont communs) !

Crois en ma fidèle amitié.

Monsieur le Professeur Jean-François Mornex,

J'ai appris à vous connaître au travers de ce projet de thèse. Je vous dois énormément et je vous remercie très sincèrement de l'aide désintéressée et efficace que vous avez su m'apporter (jusqu'à Montréal !) pour mon projet universitaire. Je vous dois beaucoup.

Croyez-en en mon indéfectible reconnaissance.

Monsieur le Docteur Philippe Lassalle,

Je vous remercie de me faire l'honneur de juger ce travail. J'espère avoir l'occasion de mieux vous connaître au cours de ce jury.

Croyez en l'expression de ma considération respectueuse.

Madame le Docteur Magali Olivier,

Tu m'as fait découvrir la rigueur du travail de laboratoire et tu m'as accueilli dans une institution prestigieuse. Ton impulsion a été déterminante dans une grande partie de ce travail et je t'en remercie. J'espère que nous pourrons continuer à collaborer ensemble !

Crois en ma sincère amitié.

Monsieur le Professeur Fabrice Barlési,

J'admire ton travail, ta rigueur et ton *leadership*. J'espère sincèrement que nous aurons de nombreuses occasions pour collaborer ensemble dans l'avenir. Sache que j'apprécie particulièrement de travailler avec toi et d'apprendre à tes côtés.

Crois en ma fidèle amitié.

De nombreuses personnes ont collaboré et/ou participé à ce travail. Je souhaite les remercier ici :

L'équipe de l'IFCT et notamment : Stéphanie Labonne, Franck Morin, William Lebossé, Quan Tran, et Antoine Deroy. Merci pour votre professionnalisme et votre réactivité. Merci à vous et à très vite pour d'autres projets !

L'équipe du laboratoire MMB du CIRC et particulièrement à Stéphanie Villard, Claire Tissot, Jiri Zavadil et surtout Magali Olivier. Merci pour votre enthousiasme et votre dynamisme. On continue ?

L'équipe du CEC de McGill et particulièrement à Sophie Dell'Aniello, Samy Suissa, Laurent Azoulay et à Maître Tibor Schuster. Merci de tout ce que vous m'avez appris (y compris l'Anglais... !) !

L'équipe de pneumologie du Centre Hospitalier Lyon Sud :

à toute l'équipe paramédicale de Pneumo B : merci de votre travail, de votre soutien, de vos coups de gueules, mais surtout merci de la façon avec laquelle vous prenez soin des patients : avec humanité, intérêt et affection. Ne changez rien, vous êtes au top !

à Lisa et Emilie ; à Laurence, Nathalie, Myriam : merci d'assurer (bien souvent à ma place) !

Le professeur Jean-François Mornex, à nouveau, pour m'avoir accueilli alors que j'étais à la dérive dans cette thèse. Merci de m'avoir encouragé à persévérer !

Pierre-Jean. Merci de ta confiance, de ta bienveillance et de ton soutien. Tes ennuis ne font que commencer !

A ma famille et à mes amis : Merci de votre amour et de votre amitié (respectivement) ; cela constitue le socle de ce travail.

I. RESUMÉ

INTRODUCTION :

Le cancer broncho-pulmonaire du non-fumeur est considéré comme une entité à part du fait de ses particularités épidémiologiques. Il est en outre un excellent modèle pour l'étude des facteurs de risque de cancer bronchique autres que le tabagisme actif. Il n'existe que très peu de données non-asiatiques concernant cette entité d'intérêt.

METHODE :

Le bio-observatoire national des cancers bronchiques de non-fumeurs (BioCAST / IFCT-1002) est une étude épidémiologique multicentrique prospective. Son objectif principal est de décrire une population de patient strictement non-fumeur (moins de 100 cigarettes au cours de la vie) atteint de cancer bronchique, notamment sur le plan de leur profil moléculaire somatique et de leur exposition aux facteurs de risque. Les objectifs secondaires étaient d'étudier si l'exposition aux différents facteurs de risque pouvait influencer le profil moléculaire ; et d'utiliser cette cohorte particulière (grande fréquence et diversité de mutations somatiques attendue) afin de développer un test multiplex pour le diagnostic non-invasif du profil moléculaire somatique tumoral à partir d'ADN circulant.

RESULTATS :

Au total, 384 patients non-fumeurs atteints de cancer broncho-pulmonaire ont été inclus dans cette cohorte. Deux-tiers d'entre eux étaient exposés au tabagisme passif, et il s'agissait essentiellement d'une exposition domestique touchant les femmes. Inversement, 35% des hommes étaient exposés de manière certaine à au moins un cancérogène professionnel, contre 8% des femmes. Au total, 72% des patients présentait une anomalie moléculaire, essentiellement au niveau de l'EGFR (51% de l'ensemble de la cohorte).

Le genre, ou l'exposition à différents facteurs de risque (tabagisme passif, exposition professionnelle, exposition hormonale chez les femmes) n'affectait pas de manière significative et cliniquement pertinente le profil mutationnel, avec les limites liées à de faibles effectifs dans certains groupes et aux expositions multiples. Seule l'exposition professionnelle à l'amiante et/ou à la silice semble avoir pour effet de diminuer la fréquence des mutations de l'EGFR.

Sur notre étude pilote (n=106), l'ADN circulant semble être un reflet de la masse tumorale. Le diagnostic multiplex (12 amplicons couvrant 5 gènes) utilisant la technique du séquençage de nouvelle génération est faisable, avec des résultats encourageant dans les stades 4 (sensibilité à 67% ; taux de concordance 73%).

CONCLUSION :

L'étude des CBNF est d'un intérêt certain, particulièrement pour l'étude des facteurs de risque de cancer bronchique autres que le tabac ou pour optimiser la mise en place des biopsies liquides.

MOTS CLES : Cancer broncho-pulmonaire, non-fumeur, biomarqueur, facteur de risque, ADN circulant

II. ABSTRACT

LUNG CANCER IN NEVER SMOKER IS A TEMPLATE FOR STUDYING NON-INVASIVE DIAGNOSIS OF SOMATIC BIOMARKERS AND TO ASSESS THEIR INTERACTIONS WITH RISK-FACTORS FOR CANCER.

INTRODUCTION:

Lung cancer in never smokers (LCINS) is considered as a separate entity given its epidemiological specificities. It is also a very interesting template to assess alternative risk factors for lung cancers than tobacco smoking. However, there is very little non-Asian data about this particular topic.

MATERIAL AND METHOD:

The BioCAST / IFCT1002 study is a prospective, nationwide, and multi-centric epidemiological study. Its main objective was to describe a French population of lung cancers in lifelong never smokers (less than 100 cigarette during all lifetime); with a special focus on molecular somatic profile and risk-factors exposure. Secondary objectives were to assess the interaction between risk-factor exposure and molecular profile; and to use this particular cohort to develop a multiplex test for non-invasive diagnosis of tumor mutations in circulating free DNA.

RESULTS:

Overall, 384 patients were recruited in the cohort. Two-third were exposed to passive smoking (mainly women and in domestic setting). By contrast, 35% of men were definitely exposed to occupational carcinogens versus 8% of women. Finally, 72% were found with a somatic mutation, mainly in the EGFR gene (51% of the whole population).

Gender or exposure to risk factors such as passive smoking, occupational exposure, or hormonal status in women, were not significantly associated with a specific and/or clinically meaningful molecular profile in tumor. These findings should be interpreted with caution given that some subgroups were small and/or with many simultaneous exposures. However, exposure to asbestos and/or silica was significantly associated to a decreased risk for EGFR mutation.

On the pilot study (n=106), circulating free DNA was associated with tumor burden. The multiplex diagnosis (12 amplicons on 5 genes) by next-generation sequencing was feasible and gave encouraging results in stage 4 patients (67% sensitivity, 73% concordance rate).

CONCLUSION:

LCINS is an interesting entity for the study of non-tobacco-related cancer risk factors; or to optimize liquid biopsy strategy.

KEYWORDS: Lung cancer, never-smoker, biomarker, risk factor, circulating-free DNA.

III. LABORATOIRE DE RATACHEMENT

UMR 754 « Rétrovirus et Pathologie Comparée »

Université Claude Bernard - Lyon 1

50 avenue Tony Garnier 69007 LYON

Ce travail a également été réalisé au sein des laboratoires et équipes suivantes :

Molecular Mechanism and Biomarkers Group

International Agency for Research on Cancer

World Health Organization

150 cours albert Thomas, 69372 Lyon CEDEX 08

Université McGill, Département d'épidémiologie, biostatistique et santé au travail

Centre d'Epidémiologie Clinique

Hôpital Général Juif / Institut de Recherche Lady Davis

3755 Chemin de la Côte Sainte-Catherine

Montréal, Québec, H3T 1E2 CANADA

IV. SOMMAIRE

I.	RESUMÉ	11
II.	ABSTRACT	13
III.	LABORATOIRE DE RATACHEMENT	14
IV.	SOMMAIRE	15
V.	LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES	17
VI.	INTRODUCTION : LE CANCER BRONCHO-PULMONAIRE DU NON-FUMEUR, REVUE DE LA LITTERATURE	18
	A. Définitions	18
	B. Le cancer broncho-pulmonaire	18
	C. Le cancer broncho-pulmonaire des non-fumeurs : une entité à part	25
	D. ARTICLE - Revue de la littérature sur le CBNF (<i>European Journal of Cancer</i> , 2012)	35
	E. ARTICLE - Revue de la littérature sur le CBNF à l'occasion des cours du GOLF (Revue des Maladies Respiratoires actualités, 2013)	51
VII.	L'ÉTUDE BIOCAST / IFCT1002	60
	A. Type d'étude	60
	B. Objectifs de l'étude	60
	C. Responsabilités	60
	D. Population de l'étude	61
	E. Déroulement de l'étude	63
	F. Aspect réglementaire	66
	G. Questionnaires	67
	H. ARTICLE – Protocole de l'étude BioCAST / IFCT-1002 (Revue des Maladies Respiratoires, 2013)	69
	I. Evolution des inclusions	78
	J. Amendement « Petit fumeur »	80
	K. Considérations statistiques	80
VIII.	EPIDEMIOLOGIE CLINIQUE ET MOLECULAIRE DU CANCER BRONCHO-PULMONAIRE DES NON-FUMEURS EN FRANCE	82
	A. Population de l'étude	82
	B. Exposition aux facteurs de risque	86
	C. Profil moléculaire	90
	D. ARTICLE – RESULTATS de l'étude BioCAST : analyse descriptive épidémiologique et moléculaire de la cohorte (En revue R1, <i>European Respiratory Journal</i>).	94
IX.	IMPACT DE L'EXPOSITION AUX FACTEURS DE RISQUE DE CANCER BRONCHO-PULMONAIRE SUR LE PROFIL MOLECULAIRE SOMATIQUE	122
	A. Tabagisme passif	122
	B. ARTICLE – RESULTATS de la fréquence de mutation des biomarqueurs tumoraux en fonction de l'exposition au tabagisme passif dans BioCAST (En revue R1, <i>European Respiratory Journal</i>).	126

C.	Polluants professionnels	140
D.	Facteurs hormonaux	144
X.	DISCUSSION GENERALE SUR BIOCAST	148
A.	Absence de groupe témoin	148
B.	Contrôle des biais	148
C.	Faibles inclusions	149
D.	Petits effectifs	149
E.	Expositions cumulées	149
F.	BioCAST : reflet d'une société passée	150
G.	Manque d'exhaustivité des biomarqueurs	150
H.	Études et données comparables	150
XI.	INTERETS DE L'ADN CIRCULANT EN ONCOLOGIE THORACIQUE	152
A.	Biologie de l'ADN circulant	152
B.	Méthodes d'analyse de l'ADNc	153
C.	ADN circulant et cancers	153
D.	ADN circulant et cancer broncho-pulmonaire	154
E.	ARTICLE – REVUE de la littérature sur l'intérêt de l'ADN circulant en oncologie thoracique. (Sollicitée par le comité de rédaction, Revue de Pneumologie Clinique, en révision).	159
XII.	DIAGNOSTIC NON INVASIF DES MUTATIONS SOMATIQUES GRACE A L'ADN TUMORAL CIRCULANT	176
A.	Projet d'analyse ancillaire de l'étude BioCAST / IFCT-1002	176
B.	ARTICLE – RESULTATS de l'analyse du profil moléculaire somatique par test multiplex et séquençage de nouvelle génération sur ADN circulant (<i>Clinical Cancer Research</i> , 2014). 177	
XIII.	CONCLUSION	202
XIV.	RÉFÉRENCES	203
XV.	TABLES DES ILLUSTRATIONS	210
XVI.	ANNEXES	212
A.	Article paru dans Nature à propos du cancer broncho-pulmonaire des non-fumeurs.213	
B.	Questionnaire patient utilisé dans l'étude BioCAST.....	216
C.	Questionnaire médecin utilisé dans l'étude BioCAST.....	232

V. LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

ADNc – ADN circulant

ALK - Anaplastic Lymphoma Kinase

AOR – Odd Ratio Ajusté

BioCAST – Bio-Observatoire des Cancers Broncho-pulmonaires des non-fumeurs

BRAF - v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B

CBNF – Cancer Broncho-pulmonaire des Non-Fumeurs

CBNPC – Cancer Bronchique Non à Petite Cellule

CBP – Cancer Broncho-Pulmonaire

CO – Contraception Orale

EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor

ET – Écart-type

HAP – Hydrocarbure Aromatique Polycycliques (PAH)

HER2 / ERBB2 - human epidermal growth factor receptor 2

IFCT – Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique

IIQ – Intervalle Inter-Quartile

IMC – Index de Masse Corporelle

INCa – Institut National du Cancer

KRAS - V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

NS – Non Significatif

OR – Odd Ratio

pb – paire de base

PIK3 - Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase

ROS 1 - ROS proto-oncogene 1 , receptor tyrosine kinase

THS – Traitement Hormonal Substitutif de la Ménopause

VI. INTRODUCTION : LE CANCER BRONCHO-PULMONAIRE DU NON-FUMEUR, REVUE DE LA LITTÉRATURE

A. Définitions

La définition d'un individu non-fumeur est strictement consensuelle : il s'agit d'une personne ayant fumé moins de 100 cigarettes (5 paquets standards) au cours de toute sa vie (1,2). Le terme « non-fumeur » doit ainsi s'entendre au sens anglo-saxon du terme : « jamais-fumeur » (*never smoker*). Paradoxalement, la définition d'un ancien fumeur (ou ex-fumeur ou fumeur sevré) est moins précise. Un ex-fumeur est une personne ayant fumé plus de 100 cigarettes mais ayant totalement stoppé sa consommation depuis un délai variant de 3 à 24 mois selon les auteurs. Il est vrai, qu'après un arrêt du tabac, le risque de rechute est très élevé dans la première année de sevrage, et reste réel jusqu'à deux ans. Cependant, un délai de sevrage total de 1an reste le seuil le plus communément accepté pour définir un ex-fumeur. Par opposition donc, un fumeur actif serait un individu fumant actuellement ou ayant stoppé depuis moins de 12 mois. Pour terminer, le terme « petit-fumeur » désigne des personnes ayant très peu fumé au cours de leur vie et/ou ayant arrêté depuis très longtemps (intoxication « estudiantine »). Ici aussi, la définition n'est pas consensuelle mais de nombreux auteurs retiennent un seuil de consommation de 5 paquets-années (PA)¹ et un délai depuis le sevrage total de 15 ans (Tableau 1).

Tableau 1 - Définitions des différents types de statut tabagique

Catégorie	Quantité de cigarettes fumée	Délai depuis l'arrêt total	Terme anglo-saxon
Non-fumeur	<100	-	<i>Never smoker</i>
Ex-fumeur	≥100 à ∞	≥1 an	<i>Former smoker</i>
Fumeur actif	≥100 à ∞	0 à 1an	<i>Current smoker</i>
Petit fumeur	≥100 mais < 5 PA	>15 ans	<i>Light smoker</i>

B. Le cancer broncho-pulmonaire

1. Epidémiologie

Globalement, le cancer broncho-pulmonaire (CBP) est l'une des principales causes de cancer dans le monde. En raison de son diagnostic à des stades tardifs habituellement et du pronostic de ces derniers, c'est également la première cause de mortalité par cancer. L'incidence diffère entre les hommes et les femmes, principalement en raison de leur décalage temporel dans les habitudes tabagiques. Les femmes ayant en effet commencée à fumer plus tardivement que les hommes.

¹ Paquet-année : unité utilisée pour définir la consommation tabagique d'un individu. Un paquet-année correspond à la consommation d'un paquet de cigarettes manufacturées (20 cigarettes) pendant un an. Son abréviation est PA (*pack-year*, PY en anglais)

Selon l'organisation mondiale de la santé, le CBP est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué dans le monde avec 1 610 000 nouveaux cas chaque année (13% des cancers) et la première cause de mortalité par cancer (1,38 millions chaque année). Chez l'homme, avec près de 1,1 million de nouveau cas par an, il s'agit de la première cause de cancer. C'est aussi la première cause de mortalité par cancer avec 951 000 décès attribuable chaque année représentant 23% de la mortalité par cancer. La situation est un peu différente chez la femme puisque le CBP est la quatrième cause de cancer avec plus de 510 000 nouveaux cas par an (9%) ; après le cancer du sein (23%), du colon (9%) et du col de l'utérus (9%). Avec près de 430 000 décès chaque année, le CBP est par contre la seconde cause de mortalité par cancer chez les femmes (13%) après le cancer du sein (**Tableau 2**). L'incidence dans les pays en développement a rattrapée puis dépassée celle dans les pays développés puisqu'environ 55% des CBP sont actuellement diagnostiqués dans les pays en développement (3).

En France, l'Institut National du cancer (INCa) rapporte que, chaque année, 40000 nouveaux cas de CBP sont diagnostiqués et que 30000 patients décèdent de cette maladie. Représentant respectivement 11% et 20% de l'ensemble des cancers, ces chiffres placent le CBP au quatrième rang des cancers mais à la première place de la mortalité par cancer tous sexes confondus (**Tableau 2**). À nouveau, il existe une différence entre hommes et femmes puisque le CBP est la première cause de cancer chez l'homme et la troisième chez la femme. L'incidence varie selon les régions avec un minimum en Midi-Pyrénées à 36,6 cas pour 100 000 habitants et un maximum à 57,3 pour 100 000 dans le Nord-Pas-de-Calais. Globalement, l'incidence de la maladie est superposable à la répartition des inégalités sociales.

Tableau 2 - Incidence et mortalité du cancer broncho-pulmonaire dans le monde, en union européenne et en France chez l'homme et chez la femme.

	Incidence					Mortalité			
	n	% ensemble des cancers	Taux standardisé / 100 000 hab	Rang		n	% ensemble des cancers	Taux standardisé / 100 000 hab	Rang
Monde (3)	1 608 000	12,7%	23	1		1 378 000	18,2%	19,4	1
Hommes	1 095 000	16,5%	34	1		951 000	22,5%	29,4	1
Femmes	513 000	8,5%	13,5	4		427 000	12,8%	11	2
Europe ²	309 589	11,8%	44,1	4		264 782	21,0%	36,5	1
Hommes	211 401	14,7%	66,3	2		183 369	25,9%	56,4	1
Femmes	98 188	8,2%	26,1	3		81 413	14,7%	20,6	2
France ³	39 495	11,1%	-	1		29 949	20,2%	-	1
Hommes	28 211	14,1%	51,7	1		21 326	25,0%	37,0	1
Femmes	11 284	7,3%	18,6	3		8 623	13,7%	12,9	2

En France, l'incidence des cancers du poumon chez l'homme semble avoir atteint un plateau, voir semble commencer à diminuer. Cette tendance est d'ailleurs retrouvée à l'échelle européenne. A

² European cancer Observatory. EUCAN cancer and country factsheets [Internet]. Disponible à : <http://eco.iarc.fr/EUCAN/Default.aspx> (consulté le 2 juillet 2014)

³ Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1 - Tumeurs solides [Internet]. Institut National du Cancer (INCa); 2013. Disponible à : <http://lesdonnees.e-cancer.fr/les-fiches-de-synthese/1-types-cancer/12-cancer-poumon/30-epidemiologie-cancer-poumon-france-metropolitaine-incidence-mortalite.html> (consulté le 2 juillet 2014)

l'inverse, la situation chez la femme est beaucoup plus préoccupante. En effet l'incidence et la mortalité sont en pleine augmentation ; celle-ci ayant même quasiment doublé entre 2000 et 2012.

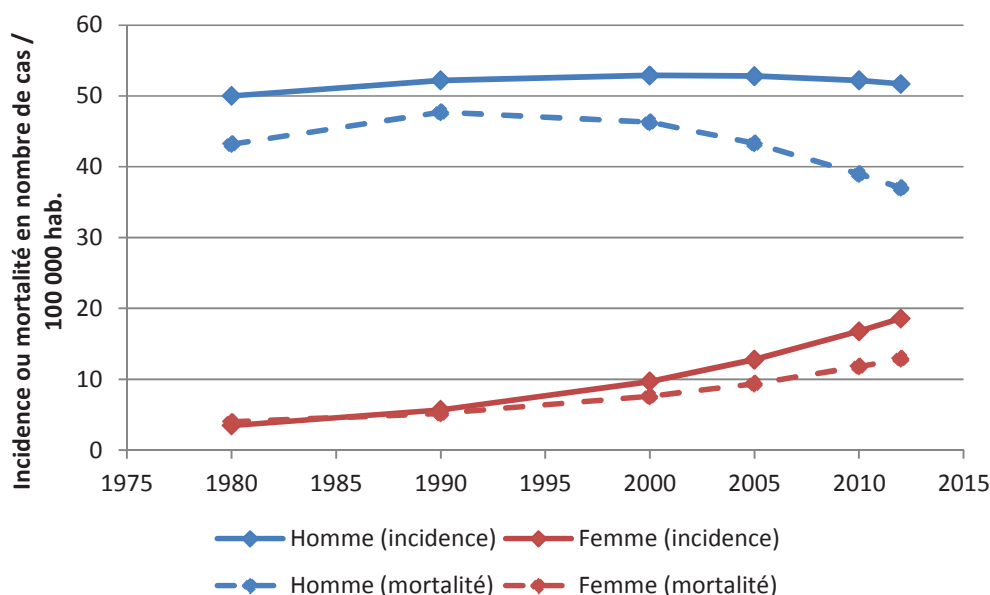


Figure 1 - Evolution des taux standardisés d'incidence (trait plein) et de mortalité (traits pointillés) du cancer broncho-pulmonaire en France chez l'homme et chez la femme.

Le CBP est l'un des cancers grevé du moins bon pronostic globalement ; le 5ème après les cancers du pancréas, de la plèvre, du foie et de l'œsophage en Europe. La survie à 5ans (standardisée sur l'âge) était de 13,8% en France pour un CBP diagnostiqué entre 2001 et 2007. Cet indicateur varie bien entendu très largement en fonction du stade au diagnostic. On sait par exemple que les cancers de stades I opérés ont une survie à 10 ans de l'ordre de 90%. Inversement, les cancers de stade avancés sont de moins bon pronostic. En Europe, la survie à 5ans moyenne est de 13%. La France se situe au 10ème rang sur les 29 pays étudiés (**Figure 2**) (4). Tandis que les survies des cancers du sein, de la prostate ou du colon se sont améliorées, le taux de survie à 5ans du CBP reste malheureusement stable en Europe depuis 1999.

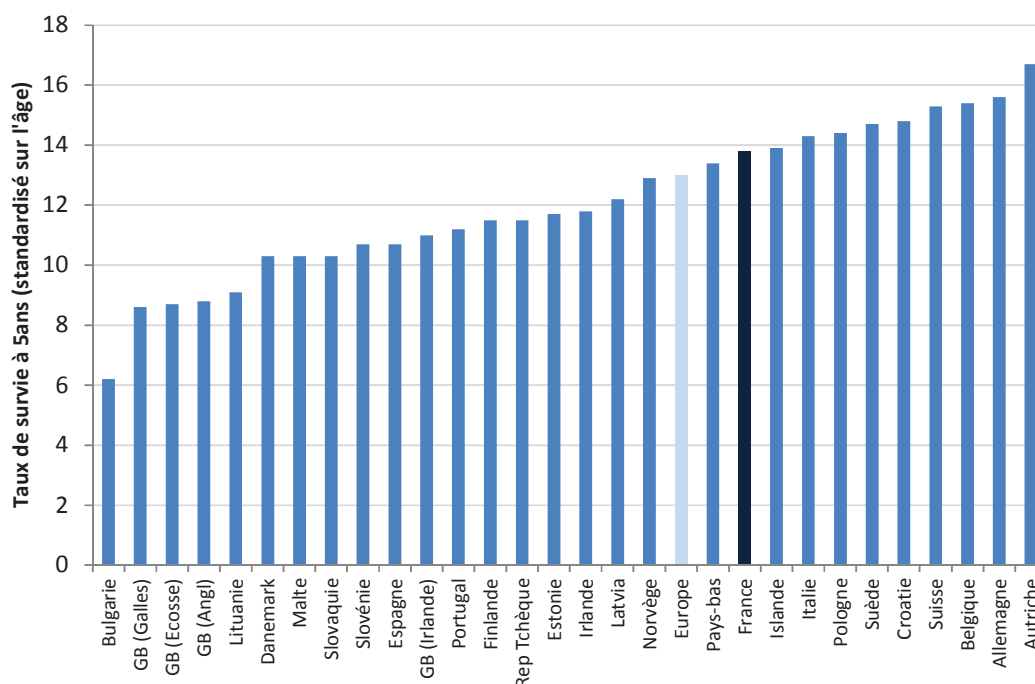


Figure 2 - Taux standardisé sur l'âge de survie à 5ans du cancer broncho-pulmonaire selon les pays d'Europe. La moyenne européenne figure en clair ; la valeur en France en foncé

Le collège des pneumologues des hôpitaux généraux Français a mené en 2010 une enquête exhaustive déclarative sur tous les nouveaux cas de cancer diagnostiqués dans plus de 100 centres en France (5). L'une des forces de cette étude est qu'une enquête en tout point similaire avait été menée en 2000, donnant ainsi une opportunité unique d'étudier l'évolution de l'épidémiologie du CBP sur ces 10 dernières années en France (6).

En 2010, près d'un quart des CBP étaient diagnostiqués chez des femmes contre 16% en 2000 ; confirmant ainsi l'augmentation de l'incidence dans cette population, en lien avec l'épidémiologie du tabagisme. L'âge moyen au diagnostic est de 65,5 ans en 2010, sensiblement identique à 2000. Lorsque l'on regarde la répartition par tranche d'âge toutefois, on observe un glissement avec moins de cancer en dessous de 50 ans et plus de cancer chez les plus de 80 ans (11% en 2010).

Les CBP sont très majoritairement diagnostiqués chez des fumeurs (89% en 2010). Ils sont essentiellement des fumeurs actifs (49% contre 40% de sevrés). L'intoxication tabagique moyenne est de 43 paquets-années au diagnostic pour une durée d'intoxication moyenne de 37,5ans. Lorsque le tabac était sevré, il l'était en moyenne depuis 15ans.

2. Diagnostic

Les circonstances de découverte du CBP sont très variées. Au minimum, il peut s'agir d'une découverte fortuite lors d'un examen radiologique de routine ou lors d'un examen de dépistage ; au maximum la maladie peut se révéler par des symptômes évocateurs de lésions métastatiques. Le bilan diagnostic

s'attachera ensuite à obtenir une preuve histologique. Cette preuve peut être obtenues de différentes manières : endoscopie bronchique souple (+/- écho-endoscopie), ponction transpariétale scanno-guidée, ou chirurgie. Le bilan d'extension est assez standardisé. Il comprend une imagerie abdominale et des surrénales, une imagerie cérébrale et une scintigraphie osseuse en cas de symptômes évocateurs. Enfin, le TEP-scanner a sa place dans le bilan d'extension des lésions paraissant isolées initialement. Le bilan d'extension ganglionnaire médiastinal repose sur l'imagerie, l'écho-endoscopie, et/ou la médiastinoscopie. Enfin, le bilan du terrain s'attachera à diagnostiquer d'éventuelles comorbidités liées au tabagisme (notamment cardio-vasculaire et respiratoire), et d'évaluer l'opérabilité et l'état général (nutritionnel notamment) du patient.

À l'issue du bilan d'extension, les tumeurs sont classées en stades pronostiques au moyen de la 7^{ème} classification TNM (7). Ce stade est l'un des facteurs pronostic de survie globale les plus robustes (8,9). L'enquête KBP-CPHG 2010 illustre que le diagnostic est le plus souvent fait à un stade tardif : 58% de stades IV et 10% de stades IIIB contre 10% de stades I et 8% de stades II (5).

Le diagnostic histologique de la maladie, permet de classer la tumeur en l'un des différents types de tumeurs malignes du poumon (10,11). La plupart de ces tumeurs sont des carcinomes développés au dépend des cellules de l'épithélium respiratoire. On distingue classiquement les carcinomes à petites cellules (CPC), représentant environ 15% des cas ; et les carcinomes non à petites cellules (CNPC). Ces derniers regroupent plusieurs sous-types histologiques parmi lesquels les adénocarcinomes, les carcinomes épidermoïdes et les carcinomes à grandes cellules. Les adénocarcinomes font l'objet d'une attention toute particulière depuis quelques années. Il s'agit en effet du type histologique émergent au dépend des carcinomes épidermoïdes dont la fréquence a nettement diminuée dans la même période (**Figure 3**). La classification des adénocarcinomes a d'ailleurs été réactualisée en 2011 (11).

Plusieurs anomalies moléculaires ont été identifiées ces dernières années comme conférant une addiction oncogénique à la tumeur (12). De plus, dans certains cas, la présence d'une de ces anomalies confère une sensibilité de la maladie à des inhibiteurs spécifiques. De ce fait, de plus en plus, le raisonnement clinique est dicté par le profil moléculaire de la tumeur. À cet effet, l'initiative de l'INCa de généraliser les analyses de génétiques tumorale en France est remarquable (13). L'étude Biomarqueurs France, commandée par l'INCa à l'Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique, est une étude portant sur les résultats de toutes les demandes de recherche de mutation faites en 2012 sur l'une des 28 plateformes de génétique moléculaire du cancer en France. Sur près de 10000 patients, 27% présentent une mutation dans KRAS⁴, 10% une mutation dans EGFR⁵, et 4% un réarrangement dans le gène ALK⁶. Enfin, 54% restent sans mutations connues (14). Ce profil moléculaire est toutefois tout à fait variable selon le statut tabagique, l'origine ethnique et le type histologique (2). Ainsi, le taux de mutation est très élevé en Asie (68%), intermédiaire en France (51%) et plus bas aux États-Unis (22%).

⁴ KRAS : v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

⁵ EGFR : epidermal growth factor receptor

⁶ ALK : anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase

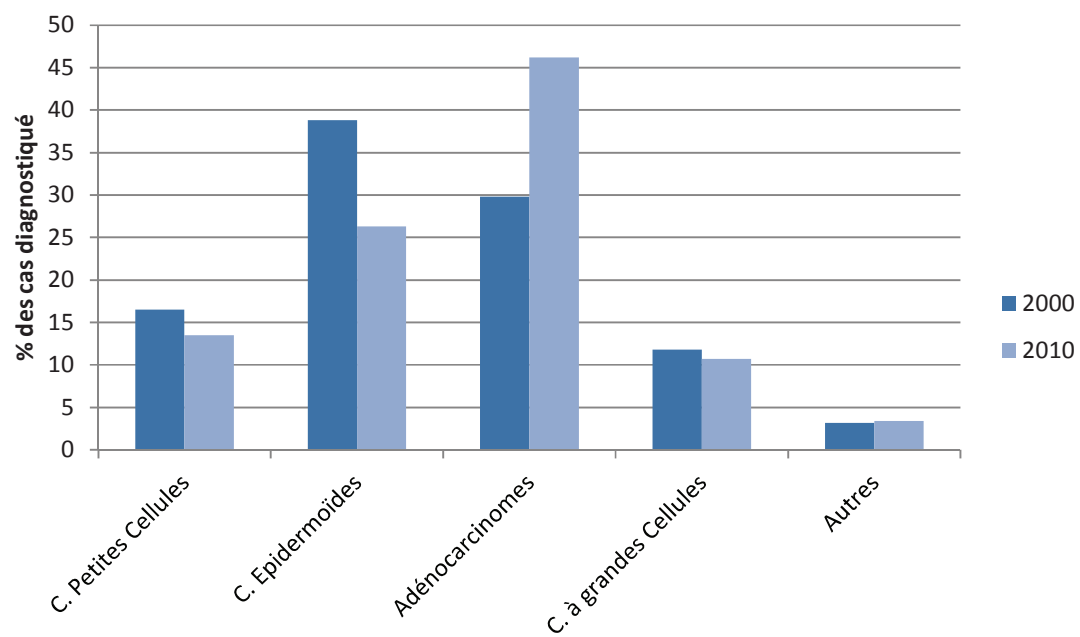


Figure 3 - Évolution des formes histologiques de cancers broncho-pulmonaires en France entre 2000 et 2010 (d'après (5))

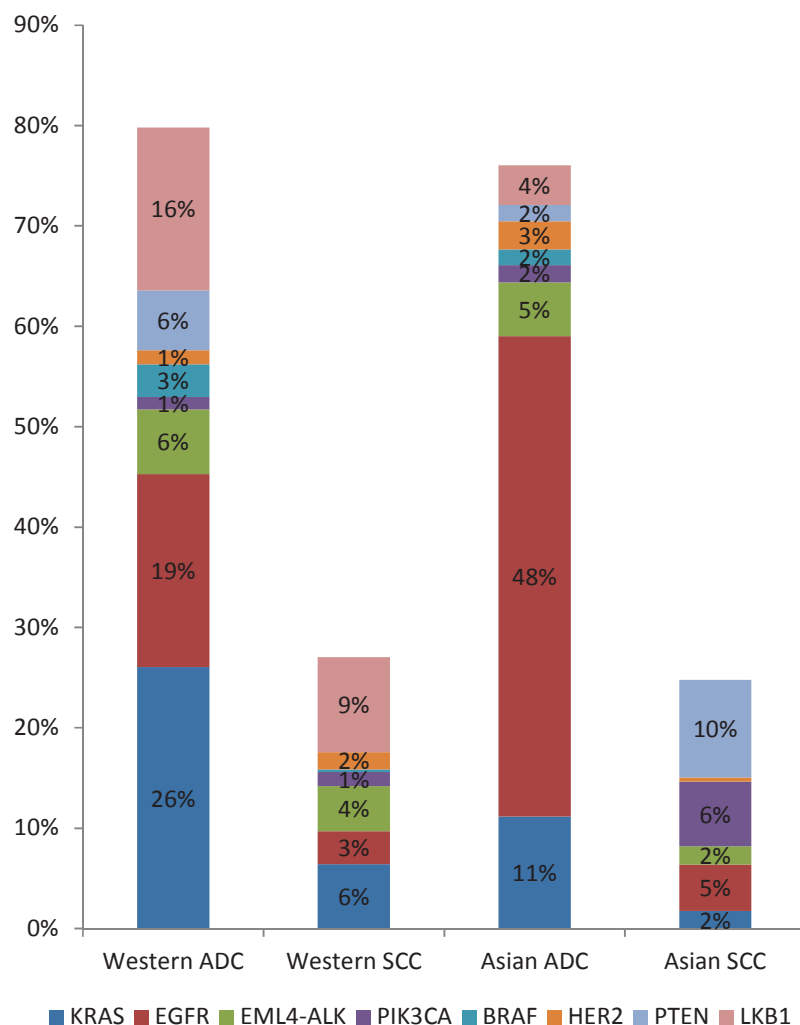


Figure 4 - Profil moléculaire en fonction du type histologique et de l'origine géographique des patients (d'après la référence (15))

3. Principes du traitement

Le traitement des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules est dicté par le stade de la maladie. Brièvement, les stades précoces (stades I, II et certains stades III) doivent bénéficier d'une chirurgie thoracique pouvant aller de la résection segmentaire à la pneumonectomie, suivie d'un curage ganglionnaire. Une chimiothérapie adjuvante est indiquée dans les stades II et III. Les stades III non résécables sont traités par chimiothérapie et radiothérapie. Enfin les stades IV (métastatiques) sont traités par traitement général (chimiothérapie ou thérapie ciblées selon les cas).

C. Le cancer broncho-pulmonaire des non-fumeurs : une entité à part

Pour la plupart des auteurs, le cancer broncho-pulmonaire des non-fumeurs (CBNF) est une entité distincte. Cette forme clinique dispose en effet de singularités cliniques, histologiques et moléculaires (1,2).

1. Epidémiologie du CBNF

En 2002, l'Organisation Mondiale de la Santé estimait que 25% des cancers broncho-pulmonaires dans le monde survenaient chez des individus non-fumeurs (16). Considéré comme une entité à part, le CBNF était alors la 7^{ème} cause de mortalité par cancer dans le monde. Le CBNF est toutefois une entité dont la prévalence est très variable selon les différentes régions du monde. Il est ainsi très fréquent en Asie du Sud-Est (plus de 20% des cas de cancer broncho-pulmonaire), mais sa prévalence en Europe et en Amérique du Nord est plus modeste (5% et 10 % respectivement) (1) (Figure 5). Aux États-Unis, il serait dans le Top 10 des causes de mortalité par cancer s'il était considéré à part (17). En Europe, il s'agirait alors de la 9^{ème} cause de mortalité par cancer chez les femmes (2). En France, nous ne disposons que de très peu de données. Le registre des cancers du Bas-Rhin retrouvait une prévalence du CBNF de 1,7% chez les hommes et 28,9% chez les femmes (18) (Figure 6). L'étude du Collège des Pneumologues des Hôpitaux Généraux retrouvait quant à lui en 2000, une prévalence de 2,5% chez les hommes et 32,3% chez les femmes (19). Ces données feraient ainsi du CBNF, la 5^{ème} cause de mortalité par cancer chez les femmes (2).

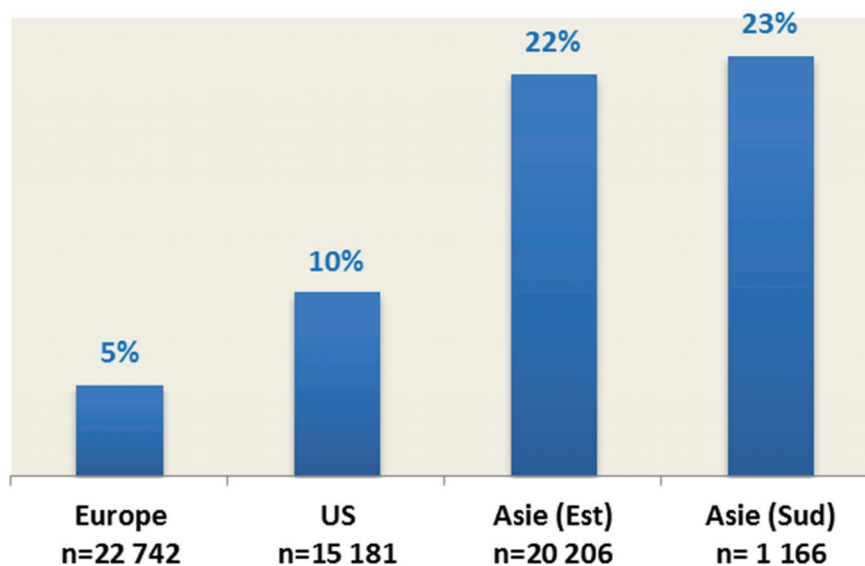


Figure 5 - Proportion des cas de cancers chez les non-fumeurs selon différentes régions du monde (d'après référence (1))

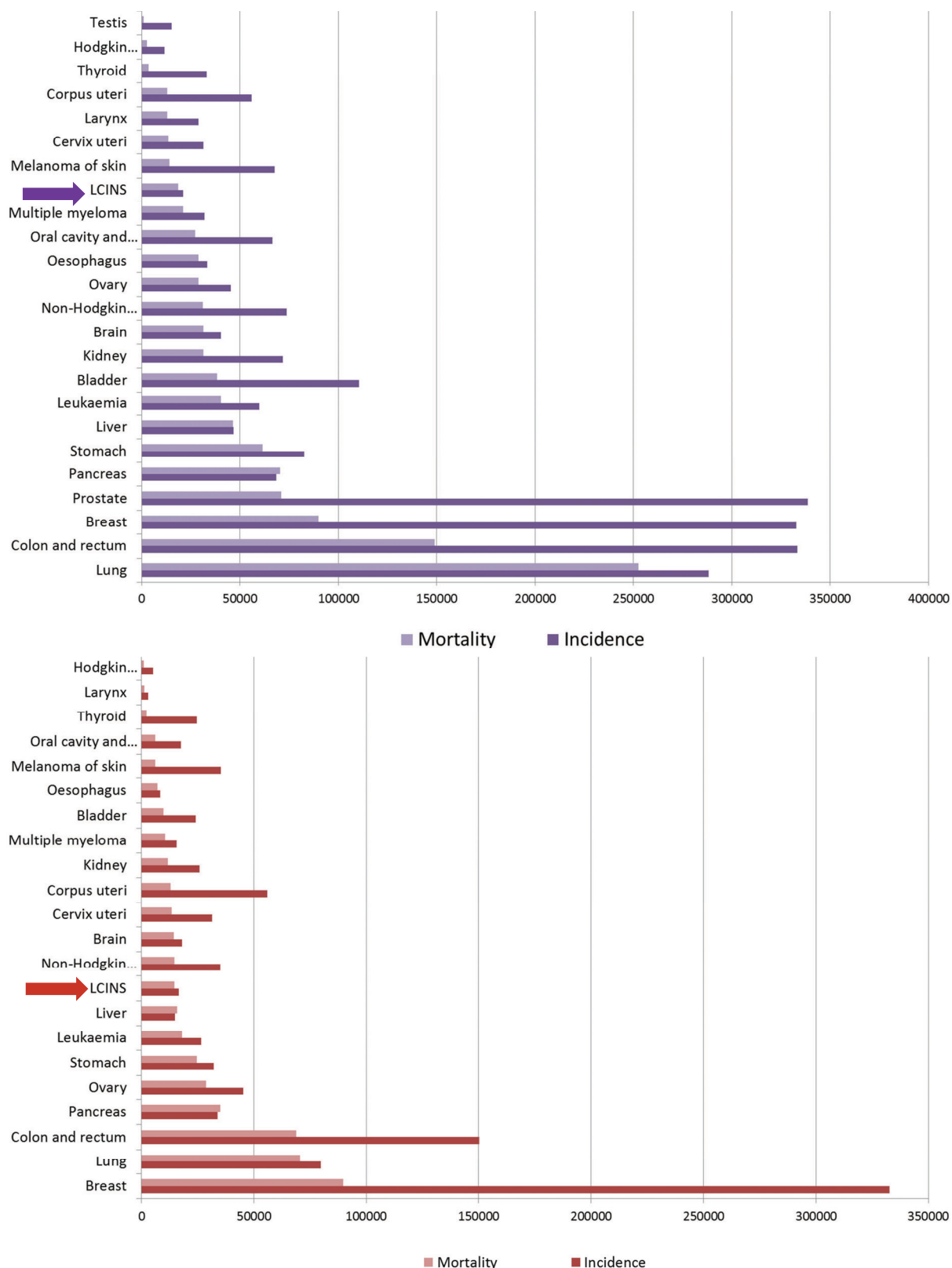


Figure 6 - Incidence et mortalité des différentes localisations de cancer en Europe dans les deux sexes (haut) et chez les femmes (bas), et considérant le cancer bronchique du non-fumeur comme une entité à part (flèche).

Dans les années 2000, l'observation d'une cohorte suédoise de près de 150 000 hommes non-fumeur, rapportait que l'incidence du CBNF avait plus que triplé entre 1976-80 et 1991-95 (20). Cette observation fut ensuite contredite par les résultats d'une très large étude groupée, multicentrique, regroupant 13 cohortes et 22 registres répartis dans le monde entier et ne démontrant pas de tendance temporelle nette concernant le CBNF (21). En France, l'étude du CPHG a été renouvelée en 2010, avec la même méthodologie, et donne donc des informations intéressantes sur l'évolution du CBNF. On découvre ainsi que la proportion de cancers broncho-pulmonaires diagnostiquée chez des non-fumeurs a progressé significativement de 7% en 2000 à 11% en 2010 ($p<0,0001$) (5) (Figure 7). Il existe, quoi qu'il en soit de nombreux biais rendant difficiles l'analyse précise de l'évolution de cette entité ; à commencer par la définition du statut de non-fumeur qui – bien que consensuelle – est souvent mal connue et donc mal recueillie dans les études. La diminution de la prévalence du tabagisme et le vieillissement de la population sont d'autres facteurs explicatifs à prendre en compte (22).

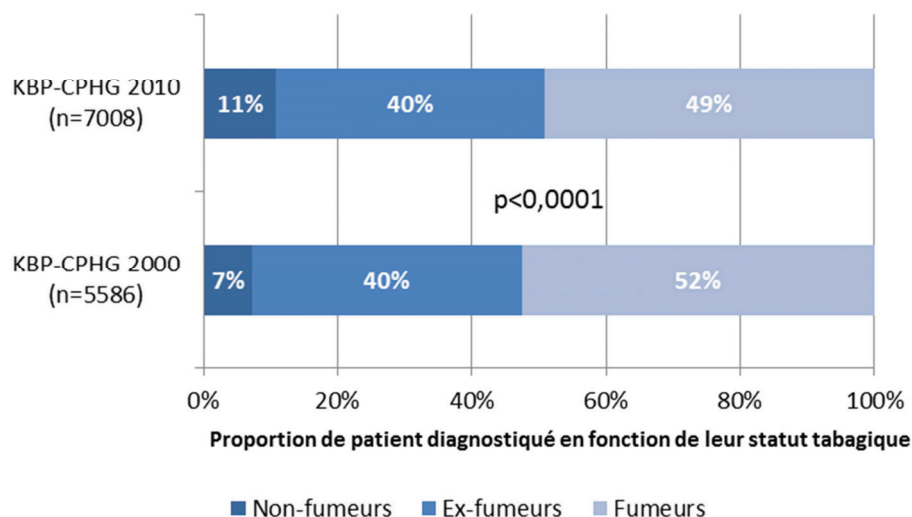


Figure 7 - Diagnostic de cancer broncho-pulmonaire en 2000 (bas) et 2010 (haut) en fonction du statut tabagique. D'après référence (5).

2. Particularités histo-cliniques

Toutes les études de la littérature s'accordent sur le fait que le CBNF est une entité touchant essentiellement les femmes (1,2). Concernant l'âge de survenue, les données sont pauvres et divergentes. En Asie, il semble que le CBNF touche plus volontiers des gens jeunes (23). Inversement, en France, les études sur les sujets âgés retrouvent une plus grande proportion de non-fumeurs et cette proportion augmente avec l'âge (24).

Sur le plan histologique, les CBNF sont essentiellement des adénocarcinomes. Les carcinomes épidermoïdes et à grandes cellules sont peu fréquents et les cancers à petites cellules sont exceptionnels (1,2).

3. Profil moléculaire des CBNF

L'une des particularités des CBNF est justement le profil moléculaire de ces cancers. Ce profil est en effet très différent par rapport aux mutations observées chez les fumeurs. Ainsi, les mutations des gènes de la famille HER, EGFR et ERBB2/HER2, sont beaucoup plus fréquentes chez les non-fumeurs. De même les réarrangements dans les gènes ALK, ROS1 et RET sont l'apanage des non-fumeurs (2,25,26). Inversement, les mutations de KRAS sont la première anomalie oncogénique chez les fumeurs alors qu'elle est plus rare chez les non-fumeurs. De plus, lorsqu'elles existent, les mutations de KRAS sont plus volontiers des transversions GT chez les fumeurs et des transitions GA chez les non-fumeurs (27,28). Enfin, les mutations de BRAF semblent plus fréquentes chez les fumeurs (29–31) (Tableau 3).

Tableau 3 - Comparaison schématique du profil somatique des tumeurs broncho-pulmonaires en fonction du statut tabagique du patient

	Biomarqueur	Jamais-fumeur	Fumeur
Famille HER	EGFR	++	-
	HER2	+	
Famille RAS	KRAS	-	++
	BRAF		+
	NRAS		+
Réarrangements	ALK	+	
	ROS1	+	
	RET	+	

Les premiers résultats de l'étude Biomarqueur France, portant sur près de 10000 patients ont été présentés à l'ASCO en 2013 et sont en cours de publication. Une analyse a notamment porté sur l'analyse du profil mutationnel en fonction du statut tabagique (14).

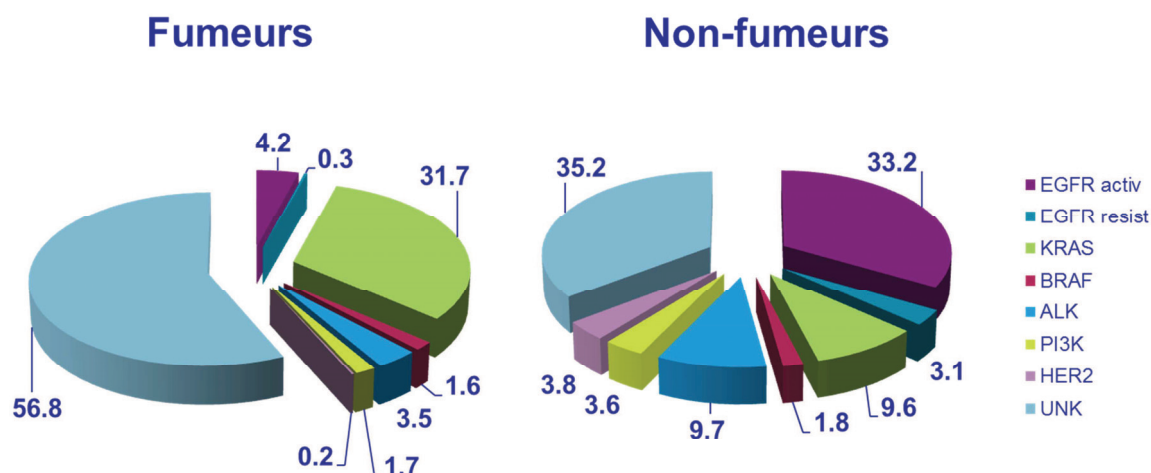


Figure 8 - Biomarqueur en fonction du statut tabagique dans l'étude Biomarqueur France (n=9911; d'après référence (14))

4. Facteurs de risque des CBNF

Outre la consommation de tabac, il existe de nombreux autres facteurs de risque de cancer broncho-pulmonaire pouvant être impliqués dans les CBNF. Il est habituel de les classer en cinq familles :

i. Toxiques inhalés

Le rôle du tabagisme passif comme facteur de risque de CBP est bien démontré et s'établit autour de 25%. Cette relation est retrouvée tant pour l'exposition dans le contexte professionnel que domestique, particulièrement lorsqu'elle a lieu dans l'enfance. Il existe d'ailleurs une relation linéaire entre le risque de développer un cancer chez le conjoint exposé et le nombre de cigarette fumé par le conjoint-fumeur, tout autant que pour la durée de vie commune (32). Malgré cela le tabagisme passif reste un fléau mal contrôlé puisqu'une récente enquête de l'organisation mondiale de la santé montrait qu'un tiers des adultes et 40% des enfants dans le monde était exposés au tabagisme passif (33).

La consommation inhalée de cannabis semble être un facteur de risque indépendant (du tabagisme notamment) de CBP, particulièrement chez les jeunes. En effet, une étude néo-zélandaise a démontré que le risque de CBP augmentait de 8% pour chaque incrément de l'exposition de 1 joint-année (1 joint par jour pendant 1 an sur le même principe que le paquet-année) (34). Des résultats similaires ont été obtenus dans une étude du Centre International de Recherche sur le Cancer menée au Maghreb (35).

ii. Polluants professionnels

L'exposition aux cancérogènes professionnels serait responsable de 20% des cancers broncho-pulmonaires en France. Leur identification est particulièrement importante puisque ce sont des maladies qui peuvent donner lieu à une indemnisation. Il existe malheureusement une sous déclaration importante, possiblement liée à une difficulté à dépister ces expositions en raison du grand nombre d'agent et

d'activité possiblement en cause (36). La rédaction du certificat médical initial incombe au clinicien mais une consultation spécialisée de médecine professionnelle peut être une aide appréciable (37).

En France, certaines expositions sont inscrites au tableau des maladies professionnelles ce qui permet de faciliter leur reconnaissance. Il existe en effet pour chacun des tableaux une liste indicative des activités ainsi qu'un délai d'exposition. Pour les autres, l'imputabilité sera investiguée par un comité régional.

Le Tableau 4 reprend les principaux agents cancérogènes d'origine professionnelle reconnue par le CIRC et la référence du tableau applicable en France, dans le cadre du régime général des travailleurs salariés de la Caisse Nationale d'Assurance Maladie.

Tableau 4- Liste des agents classés comme cancérogène certains pour le poumon par le Centre International de Recherche sur le Cancer et dont l'usage peut être professionnel et tableau de maladie professionnelle correspondant (régime général)

Agent cancérogènes certains (CIRC) ⁷	Tableau (régime général) ⁸
Production d'Aluminium	
Arsenic et composés inorganiques d'arsenic	20 BIS et TER
Amiante (toutes formes)	30 BIS
Beryllium et composés	
Bis(chloromethyl)ether; chloromethyl methyl ether	81
Cadmium et composés	61 BIS
Composés du chrome	10 TER
Gazéification du charbon	16 BIS
Brai de houille, cokerie	16 BIS
Fumées de moteur, diesel	
Extraction d'hématite (mines en sous-sol)	
Fonte de fer et d'acier	44 BIS
Composés du Nickel	37 TER
Peintures	
Plutonium	
Radon 222 et ses dérivés	
Production industrielle de caoutchouc	
Poussière de silice, silice cristalline	25
Suies	
Gaz moutarde	
Rayons X et Gamma	6
<i>Cobalt et carbure de Tungstène*</i>	70 TER

*Agent reconnu comme cancérogène possible pour le poumon par le CIRC

⁷ Source : Site Internet du CIRC (librement traduit) : <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/Table4.pdf>

⁸ Source : site Internet de l'INRS : <http://www.inrs-mp.fr/mp/cgi-bin/mppage.pl?>

4. Pollution environnementale

La pollution atmosphérique appartient à la catégorie des cancérogènes certains pour le poumon du CIRC et serait à l'origine de près de 4% des cancers broncho-pulmonaires en France (38,39). La pollution est habituellement divisée en pollution gazeuse (oxydes de soufre, d'azote...) et particulaire (PM10 et PM2.5) qui sont toutes les deux impliquées dans la cancérogenèse pulmonaire. Le diesel fait partie de la pollution particulaire.

Ainsi chaque incrément de 10µg/m³ de la concentration de PM2.5 dans l'air augmenterait de 14% le risque de cancer broncho-pulmonaire aux États-Unis. À l'inverse, la réduction des émissions de PM2.5 augmenterait l'espérance de vie (toute cause) de 0,61 ans pour chaque diminution de 10µg/m³ (40,41).

En Europe, l'étude ESCAPE a montré que le risque de CBP augmentait de 22% pour chaque incrément de 10µg/m³ dans l'air de la concentration des PM10 (42). Ces données prennent toute leur importance lorsque l'on sait que peu de pays et de villes arrivent à respecter les seuils recommandés par l'Organisation Mondiale de la Santé.

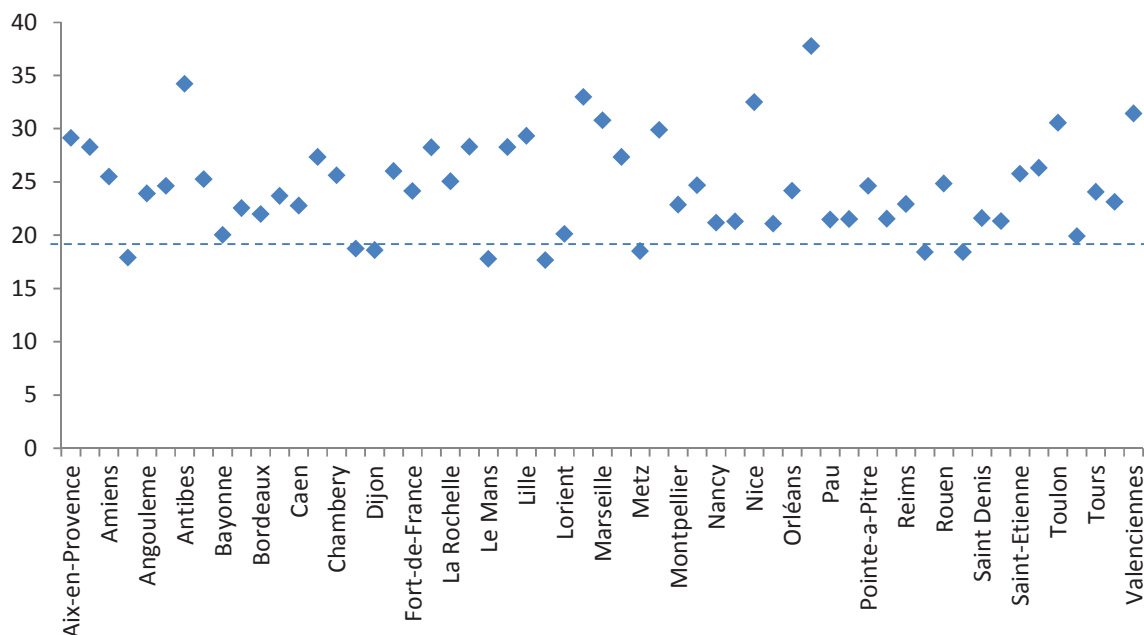


Figure 9- Concentration annuelle moyenne en PM10 dans différentes villes de France en 2008. La ligne pointillée indique le seuil recommandé par l'OMS⁹.

On ajoute volontiers le Radon dans la liste des polluants environnementaux ayant un effet cancérogène certain pour le poumon.

Le Radon222 est un gaz naturel produit par la dégradation de l'uranium238 dans la croûte terrestre (radioactivité naturelle). Sa demi-vie longue de 4heures lui permet de diffuser à travers le sol et de gagner l'air avant de se désintégrer en particule alpha.

⁹ Source : WHO Database on outdoor pollution in cities, http://www.who.int/phe/health_topics/outdoorair/databases/en/index.html

Le risque de cancer broncho-pulmonaire augmente de manière linéaire avec la concentration en radon dans l'air (+8% chaque incrément de 100Bq/m3 de Radon222). L'effet est synergique chez le fumeur (43,44).

En France, le Radon fait l'objet d'une surveillance extensive et d'une politique de contrôle.

5. Pollution domestique

La pollution domestique est, elle aussi, inscrite sur la liste des cancérogènes certains du CIRC. Il s'agit :

- De l'exposition aux fumées issues de la combustion des combustibles solides (bois, charbon, déchets,...) utilisés pour le chauffage et la cuisine (45). En Europe, le risque de CBP augmenterait de 22% chez les individus exposés aux fumées domestiques dans une étude du CIRC (36).
- Des vapeurs d'huile de cuisson utilisées pour la cuisine frite ou sautée (cuisine traditionnelle asiatique). Il existe même une relation dose-effet entre l'exposition aux vapeurs d'huile de cuisson (exprimée en plat-années) et l'incidence du CBNF (46) (Figure 10).

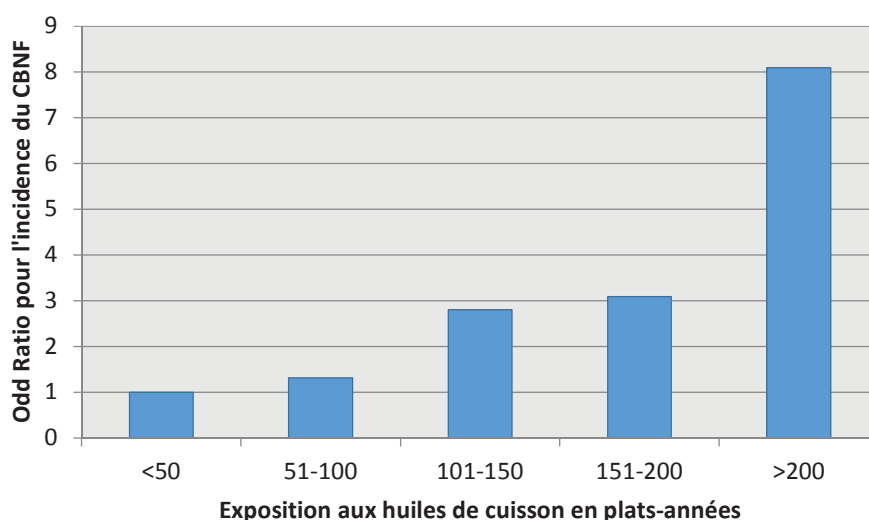


Figure 10 - Evolution du risque de survenue d'un CBNF en fonction de l'exposition aux vapeurs d'huile de cuisson dans une cohorte de femmes non-fumeuses asiatiques (adapté de la référence (46)).

6. Antécédents personnels et familiaux

Les autres facteurs de risque de cancer broncho-pulmonaire sont :

- Les antécédents familiaux de cancer broncho-pulmonaires (à partir de deux antécédents chez les ascendants ou descendants biologiques au 1er degré notamment) (47),
- Les antécédents personnels de bronchopathie chronique (48),

- Les antécédents personnels de pneumonie et de tuberculose (y compris dans les pays de faible incidence) (48),
- Chez la femme, des facteurs hormonaux pourraient être impliqués (2),
- Un faible niveau socio-professionnel est également associé à un risque accru (49).
- Une consommation de fruit et légume importante et variée serait protectrice (50,51). L'alcool semble par contre sans effet (52).

D. ARTICLE - Revue de la littérature sur le CBNF (*European Journal of Cancer*, 2012)

Couraud S, Zalcman G, Milleron B, Morin F, Souquet PJ. Lung cancer in never smokers--a review. *Eur J Cancer*. 2012 Jun;48(9):1299-311.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Available at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: www.ejconline.com



Review

Lung cancer in never smokers – A review

Sébastien Couraud^{a,b,*}, Gérard Zalcman^{b,c}, Bernard Milleron^{b,d}, Franck Morin^b,
Pierre-Jean Souquet^{a,b}

^a Service de Pneumologie et Oncologie Thoracique, Hospices Civils de Lyon, CH Lyon Sud, et Université Lyon 1, Lyon, France

^b Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique, Paris, France

^c Service de Pneumologie et Oncologie thoracique & UMR Inserm 1086 Cancers et Prévention, CHU Côte de Nacre, 14033 Caen, France

^d Service de Pneumologie, Hôpital Tenon, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Paris, France

Available online 28 March 2012

KEYWORDS

Lung cancer
Never smoker
Pollution
Biomarkers
Genetic polymorphism
Genome wide association
study

Abstract An estimated 10–25% of lung cancers worldwide occur in never smokers, i.e. individuals having smoked less than 100 cigarettes in their lifetime. Lung cancer in never smokers (LCINS) is more frequent in women, although large geographic variations are found. Histologically, adenocarcinomas predominate.

The mere existence of LCINS suggests that risk factors other than smoking must be present. Exposure to environmental tobacco smoke (particularly in women) and exposure to workplace carcinogens (particularly in men) are the two most important alternative risk factors. However, a history of either is absent in more than a third of LCINS. The large proportion of women in LCINS suggest a hormonal element that may interact with other identified factors such as hereditary risks, a history of respiratory infections or disease, exposure to air pollution, cooking and heating fumes, or exposure to ionising radiation.

The study of genomic polymorphisms finds constitutive DNA variations across subjects according to their smoking status, particularly in genes coding for enzymes that participate in the metabolism of certain carcinogens, in those coding for DNA repair enzymes, or in genes associated with tobacco addiction, or inflammatory processes. The type of molecular mutation in *p53* or *KRAS* varies with smoking status. *EGFR* mutations are more frequent in never smokers, as are *EML4-ALK* fusions. The mutually exclusive nature of certain mutations is a strong argument in favour of separate genetic paths to cancer for ever smokers and never smokers.

In the present paper we review current clinical and molecular aspects of LCINS.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Tobacco use is the oldest¹ and most well-established² risk factor for lung cancer. However, this malignancy occurs in a very small number of patients who have no

* Corresponding author at: Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud., Service de Pneumologie et Oncologie Thoracique, 165 Chemin du Grand Revoyet, 69495 Pierre Bénite Cedex, France. Tel.: +33 4 78 86 44 05; fax: +33 4 78 86 44 19.

E-mail address: sebastien.couraud@chu-lyon.fr (S. Couraud).

history of smoking. Lung cancer in never smokers (LCINS) has only been described in detail in the past 5 years^{3–5} and its frequency is increasing according to some authors. LCINS has been found to be accessible via targeted treatments, and thus has become the subject of major research.^{6,7} The present article focused on providing an in-depth literature review of LCINS.

A 'never smoker' is commonly defined as an individual who has smoked less than 100 cigarettes over his or her lifetime. Never smokers are thus differentiated from 'ever smokers' (more than 100 cigarettes over their lifetime), who are normally sub-categorised as either 'ex-smokers', i.e. those who have currently and completely stopped smoking for more than 1 year, and 'current smokers', i.e. those who currently smoke or have quit for less than 1 year.^{3,8} The concept of 'light smoker' lacks clarity and is debatable, as there is no tobacco threshold effect for the risk of lung cancer. In IPASS study, authors have defined light smokers as people who have smoked less than 10PY in their lifetime and quit smoking since at least 15 years.⁹ This cut-off value seems henceforth too high. Although no official definition has been established, a history of less than 5 pack-years is now commonly thought of as light smoking. Debate continues on where the reported incidence of LCINS in recent years represents a true increase. In 2001, Bofetta et al. observed a significant increase in the incidence of LCINS in a Swedish cohort: from 1.5/100 000 in 1976–1980 to as much as 5.4/100,000 in 1991–1995.¹⁰ Their results seemed to confirm earlier observations suggesting a progressive increase in LCINS since the 1930s^{11,12} and the emergence of non-tobacco related lung cancer risks. However, in a large analysis of cohorts and registries, Thun et al. observes no significant temporal trend in LCINS incidence and mortality among United States of America (US) never smokers from 1959 to 2004.^{13,14} The authors of a recent work found a decrease incidence in men but increase in women when compared to the preceding generation.¹⁵ Leaving methodology debates aside, an increase in LCINS incidence could be real, or the result of the decrease in the proportion of ever smokers in some strata of the general population, and/or ageing within these categories.¹⁶

The World Health Organisation estimates that 25% of lung cancer worldwide occurs in never smokers.¹⁷ This percentage is probably closer to 10–15% in Western countries. However, LCINS proportions vary widely, from more than 50% in women in Southeast Asia, to approximately 2–6% in men in Western series.^{3,8,18} If considered as an independent entity, LCINS is the 7th largest cause of cancer-related mortality in the world¹⁹ and a top-ten cause of death in the United States.^{14,20} In France a study of the *Bas Rhin* registry found LCINS proportions of 1.4% and 28.9% respectively in men and women²¹; within the KBP-2000 study, these proportions were 2.5% and 32.3%.²² Comparing these results to

cancer mortality estimations for France in 2011,²³ LCINS represents the 3rd-leading cause of death by cancer in women. At the European level, data from the European Cancer Observatory²⁴ show that LCINS is the 17th cause of cancer mortality (9th for women, see [Supplementary Fig.1](#)). There is thus a considerable geographical effect, particularly in women, for LCINS. Indeed, the malignancy is more frequently diagnosed in Asia than it is in the United States, and more frequently in the United States than in Europe. However its ethnic/genetic attributes and/or environmental factors remain unknown.³

2. Clinical and pathological presentation

In all LCINS series, women are systematically over-represented.^{3,5,6,8,25} Mortality rates in female patients are of the same as for male patients.¹⁴

Contradictory data exist concerning age and diagnoses of LCINS, with some authors reporting the cancer's penchant for older patients, while others find it in significantly younger patients. The data from several French studies tend to illustrate a predominance of LCINS in advanced-age patients. In the KBP-2000 study, the proportion of never smokers was 5.3% before 70 years of age, and 11.2% after.²² The IFCT 0202 study on lung cancer in elderly patients found an overall proportion of 11.2% for never smokers with an age-progressive increase in frequency: from 7.2% in patients aged 70–74 years to 17.2% in patients over 80.²⁶ Conversely, a younger age at diagnosis was found in several Asian series, which may illustrate different carcinogenic mechanisms. Tho et al. found a mean age at diagnosis of 62 years for never smokers (compared to 72 and 67 for ex-smokers and current smokers, respectively).⁴ Kawaguchi et al. reported that patients aged less than 59 years with lung cancer are more frequently never-smokers than ever smokers.²⁷

Small-cell lung cancer is very rare in never smokers.²⁸ In non-small cell lung cancer (NSCLC), the most frequent histological type is adenocarcinoma. An analysis of 17 published studies found 3.4 times more adenocarcinomas than squamous cell carcinomas in LCINS patients ($p < 0.0001$),³ confirming numerous findings from other studies.^{4,5,8,18,25}

3. Lung cancer risk factors other than smoking (Table 1)

Lung cancer in individuals who do not smoke obviously suggests the existence of risk factors other than tobacco (Table 1).^{3,8,18,29} These other risk factors are in no way found exclusively in never smokers; indeed, different risk factors, related or not to smoking, are frequently associated and sometimes cumulative or synergic. Several epidemiological studies have identified several factors associated with risk of lung cancer. From

Table 1

Principal risk factors (excluding occupational exposure) of lung cancer and corresponding estimated risks as reported in the studies analysed in the present review.

Risk factor	Estimated risk(95% confidence interval)	Population	Ref.
Family history	OR = 1.40 (1.17–1.68)	Never smokers (meta-analysis)	147
Use of menopausal hormone replacement therapy	OR = 1.76 (1.072–2.898)	Women, never-smokers, adenocarcinoma, (meta-analysis)	57
Environmental tobacco smoke	OR = 1.26 (1.07–1.47)	Never smokers (meta-analysis)	32
Domestic radon exposure	10.6% (0.3–28.0) per increase of 100 Bq/m ³	Never smokers (meta-analysis)	61
Air pollution – increase of 10 µg/m ³ in PM _{2.5}	HR = 1.24 (1.12–1.37)	General population	66
Air pollution – increase of 10 ppb in SO ₂	HR = 1.26 (1.07–1.48)	General population	66
Air pollution – increase of 10 ppb in NO ₂	HR = 1.17 (1.10–1.26)	General population	66
Cooking oil fumes	OR = 2.12 (1.81–2.47)	Women, never smokers, Chinese (meta-analysis)	67
Smoke from domestic combustion for heating and cooking	OR = 1.22 (1.04–1.44)	General population, Europe	70
Patient history of tuberculosis	RR = 1.90 (1.45–2.50)	Never smokers (meta-analysis)	81
Patient history of COPD/emphysema/chronic bronchitis	RR = 1.22 (0.97–1.53)	Never smokers (meta-analysis)	81
Patient history of parenchymal infection	RR = 1.36 (1.10–1.69)	Never smokers (meta-analysis)	81
Low socioeconomic status	RR = 1.65 (1.19–2.28)	General population (meta-analysis)	78
High intake of fruit	OR = 0.60 (0.46–0.7)	General population but higher in current smokers	85

OR = Odds ratio, HR = Hazard ratio, RR = Relative Risk, COPD = Chronic Obstructive Pulmonary Disease.

those, most are linked to pollution: occupational, environmental (including second hand tobacco smoke) and domestic.

Unfortunately, data are lacking on the relative importance of these alternative risk factors. In 2009, Clément-Duchêne et al. found that 63% of lung cancers in a French cohort of 67 never smoking lung cancer patients were due to environmental tobacco smoke (ETS) and occupational exposure to carcinogens. Those authors also found that gender was an important element of these two particular risk factors: 78.6% of women were exposed to environmental tobacco smoke versus 21.4% of men ($p < 0.0001$), and conversely 48.6% of men were exposed to occupational carcinogens versus 9.4% of women ($p < 0.0005$). However, they also found that 40% of LCINS in men and 31.2% in women were due to other causes.³⁰

3.1. Exposure to environmental tobacco smoke

Today, the association between exposure to ETS and lung cancer has been largely demonstrated.³¹ The authors of a 1997 meta-analysis on passive smoking in couples, found an odds ratio (OR) of 1.26 (95% confidence interval (95% CI) = 1.07–1.47) and a linear relation between cancer risk and both the quantity of cigarettes smoked by the smoking partner and the duration of exposure.³² Their observations converge with those of other authors who also found residential,^{33,34} or workplace³⁵ exposure to ETS to be linked to a risk of cancer. Recently, a study on data from 192 countries reported that 40% of children and approximately a third

of never-smoker adults were exposed to ETS in 2004. In that same year, more than 600,000 deaths (including 21,400 lung cancers) were attributable to exposure to ETS, thus representing 1% of worldwide mortality.³⁶ These observations are also supported by biological data. For example, some authors have found that *EGFR* gene mutations are inversely proportional to exposure to ETS,³⁷ and others that *in utero* exposure to ETS may cause hypermethylation of some promoter genes.³⁸ Furthermore, tobacco metabolites have been found in 90% of urine samples from children with parents who smoke.³⁹ Finally and more recently, Authors of an Asian study observed differences in the frequencies of certain molecular abnormalities that may be explained by different levels of exposition to ETS.⁴⁰

3.2. Occupational exposure to carcinogens

Respiratory system cancers are the most frequent occupationally-acquired malignancy. In France, occupational lung cancers are under-reported despite a legal requirement for their declaration and the availability of decision support tools.⁴¹ The International Agency for Research on Cancer (IARC) recognises numerous pulmonary carcinogens, of which asbestos, crystalline silica, radon, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and certain heavy metals are the most well-established.⁴² The list of lung carcinogens evolves constantly. For example, a recent pooled analysis of 11 studies strengthened evidence for a causative role of exposure to diesel motor exhaust in the development of lung cancer (OR = 1.31 [95% CI = 1.19–1.43]).⁴³

3.3. Hormonal factors (women)

The predominance of women among never-smoker lung cancer patients suggests a role for hormones. Oestrogen receptors (ER) α and β are expressed more frequently in cancerous lung tissue than in normal lung tissue. Conversely, progesterone receptors are less frequently expressed in cancerous tissue. Evidence suggests that the expression profile of these receptors may also be correlated with outcome.⁴⁴ ER- α seems correlated to worse prognosis in irradiated patients.⁴⁵ ER- β , contrary to ER- α , is more frequently isolated in adenocarcinoma, and *in vitro* studies have evoked its possible role in tumoural proliferation.⁴⁶ Other studies have found that ER- β is more frequently expressed in women and in never-smokers⁴⁷ as well as in certain adenocarcinoma subtypes.⁴⁸ Patients strongly expressing ER- β were found to have a higher frequency of *EGFR* mutation and better survival when treated with tyrosine-kinase inhibitors (TKI).⁴⁹ However, the ER- β -coding *ESR2* polymorphism does not appear to be associated with a risk of cancer.⁵⁰

The association between post-menopausal hormone replacement therapy (HRT) and lung cancer risk is still being debated. No link was found in a recent study of 60,000 California (US) teachers, the results of this cohort confirming those of the Nurses' Health Study.^{51,52} However, another study on a prospective cohort of 35,000 women demonstrated a duration-associated risk in patients receiving oestrogen + progestin, with a large risk appearing after 10 years of treatment.⁵³ These latter findings were concordant with those of another prospective cohort study on 90,000 Canadian women.⁵⁴ Adding to the debate, the Women's Health Initiative trial (comparing HRT against placebo in more than 16,000 women) did not find a significant increased incidence of lung cancer in the HRT arm, but did find a significant increase in lung cancer mortality, with no notable effect attributable to smoking status.⁵⁵ Another clinical study found only a non-significant increase in lung cancer in women HRT treatment.⁵⁶ A recent meta-analysis did not find a global increase in risk. It did however report an increased risk in never-smoker women with adenocarcinoma who had or were receiving hormone therapy (OR = 1.76 [95% CI = 1.072–2.898]).⁵⁷

The role of hormonal contraceptives is also controversial. In the English cohort (107,000),⁵² an elevated risk of lung cancer (HR = 1.22 [95% CI = 1.05–1.42]) was found in women with a greater than 5-year history of hormonal contraception use; this however was not found in the Canadian cohort (89,835).⁵⁴

Nulliparity did not appear to be associated with an increase in risk, although parity greater than 5 did in the Canadian cohort (HR = 1.42 [95% CI = 1.06–1.88]). Conversely, in the English cohort, increased parity appeared to offer a protective effect in never smokers.

The findings of the two studies were also contradictory concerning the effect of age at first birth in never smokers, with the Canadian study finding reduced risk in women who gave birth for the first time after the age of 30 and the English study increased risk.

More recently, a study using the American NIH-AARP cohort (180,000 women) found a reduced risk of cancer when age at menarche was greater than 15 (compared to menarche before 15). Conversely, an increased risk was found in women with early menopause (natural or the result of surgery), although this was particularly true for ever smokers. The associations between lung cancer and parity, age at first birth, and hormone use were not found in the NIH-AARP cohort.⁵⁸ Finally, a study has also reported a decreased incidence of lung cancer in women having undergone anti-oestrogen therapy for breast cancer.⁵⁹ Taken as a whole these data suggest there may be a role for sexual hormones, particularly oestrogens, in lung cancer in women.

3.4. Environmental exposure to radon

Radon was established as a risk factor for lung cancer through studies on exposed professionals, for example uranium miners.⁶⁰ In the absence of other causes of death, the risk of lung cancer for never smokers exposed to concentrations of 0, 100 and 400 Bq/m³ of radon are respectively 0.4%, 0.5% and 0.7%. In ever smokers, these risks are approximately 25 times greater.⁶¹ These results are in keeping with those of an American Cancer Society study reporting an increase in risk of 34% (95% CI = 7–68%) for people exposed to radon above the threshold value of 148 Bq/m.³⁶²

3.5. Air pollution

Several studies have reported an increase in cancer risks as a function of exposure to certain air pollution components. It is furthermore estimated that 1–3.6% of lung cancers in Europe may be linked to atmospheric pollution (as much as 5–7% in never smokers).^{63–66}

3.6. Household fumes

Exposure to household fumes groups the inhalation of cooking oil vapours and the particles emitted by domestic use of coal for cooking and heating. This type of exposure has been studied particularly in China, where traditional cooking practices use highly heated oils often in a poorly or unventilated kitchen. In particular, the smoke from these oils contains known carcinogenic PAHs and aldehydes.³ The authors of a Chinese meta-analysis found an OR of 2.12 (95% CI = 1.81–2.47) in never-smoker women.⁶⁷ The authors of another study in China found that installing chimneys on

household stoves led to a significant reduction in lung cancer incidence and a reduction in relative risk (RR) in a cohort of 22,000 people.^{68,69} These largely Chinese results were also found in Europe in an IARC case-control study that looked at the use of coal, charcoal and other solid fuels such as wood and dung for cooking and heating in rural communities; they found an OR of 1.22 (95% CI = 1.04–1.44) with length of exposure having a significant effect on risk augmentation.⁷⁰

3.7. Infectious factors

The association between infection, inflammation and cancer risk is well-established. It is estimated that approximately 25% of cancers involve viral infection. In lung cancer, the roles of several pathogens have been studied.

Human papillomavirus (HPV) is a well-known carcinogen in a particularly virulent form of head and neck cancer in never smokers. The authors of a 2001 Taiwanese study on 141 lung cancer patients (versus controls) found that HPV types 16 and 18 were more frequently present in tumorous lung tissue than in healthy lung tissue. The frequency at which HPV was found in tumours appeared to be higher in never-smoker patients aged more than 60 years.⁷¹ However a recent Italian study using PCR techniques found no tumours positive for HPV in their large study population.⁷²

Studies continue to demonstrate that infection with *Mycobacterium tuberculosis* is associated with a risk of lung cancer (RR = 1.74 [95% CI = 1.48–2.03]), independently of smoking status.^{73–75} Recently, a Chinese team shows that patients with pulmonary adenocarcinoma who had scar cancer or had old TB lesions had a higher probability of having *EGFR* mutations, especially exon 19 deletions.⁷⁶

3.8. Socioeconomic status

The results of a 2009 meta-analysis, appear to confirm the association of low education and revenue levels with an increased risk of lung cancer (after adjustment for smoking, OR = 1.65 [95% CI = 1.19–2.28]).⁷⁷ Furthermore, a low socioeconomic status has also been shown to be a factor for poor disease outcome and poor access to healthcare.^{78,79}

3.9. Other medical history

Certain patient medical factors have received scrutiny for a possible role in increasing the risk of lung cancer. When limited to never smokers, the relative risk for the trio COPD/emphysema/chronic bronchitis is not significant (RR = 1.22 [95% CI = 0.97–1.53]), but remained significant for those with a history of pneumonia (RR = 1.36 [1.10–1.69]) or tuberculosis (RR = 1.90 [1.45–2.50]).^{80,81}

The association between a history of organ transplantation and the development of solid cancers including lung cancer, has been well-established.⁸² Lung cancer is the second most-frequent extra-hepatic cancer in cirrhosis patients⁸³ and the most frequent second cancer after a non-Hodgkin lymphoma.⁸⁴

3.10. Dietary factors, alcohol and diabetes

The EPIC prospective study found a significant inverse association between fruit consumption and lung cancer risk: the hazard ratio for the highest quintile of consumption relative to the lowest being 0.60 (95% CI 0.46–0.7). This association was strongest among current smokers.⁸⁵ In never smokers, a recent meta-analysis, suggests that there is no association between lung cancer risk and alcohol consumption.⁸⁶ Other finding suggests that some kind of dietary pattern could affect lung cancer risk in never smokers.⁸⁷

Diabetes mellitus seems to be an independent risk factor for lung cancer.^{88–90} In the same manner, it appears to be a risk of local recurrence and poor survival^{91,92} in some observations and, a factor for better survival in others.⁹³ There is much interest in the role of metformin in lung cancer and other tumours. Indeed, recent paper shows that use of this medic is associated with better prognosis.

4. Innate molecular abnormalities – genetic susceptibility to lung cancer (Table 2)

4.1. Genomic polymorphisms (Table 2)

Polymorphisms of genes involved in carcinogen metabolism are very relevant and productive for smokers with lung cancer.

Two polymorphisms in exon 7 of *CYP1A1*, the substitutions T3801C (MspI) and A2455G (Ile462Val), are linked to an increased risk of lung cancer.⁹⁴ Specifically in Caucasian never smokers (in data pooled from 14 studies) there was a significant effect for the Ile462Val mutation (OR = 2.21 [95% CI = 1.12–4.37]) but a non-significant effect for the MspI mutation.⁹⁵ The Leu432-Val polymorphism on *CYP1B1* also appears to be associated with an increased risk of lung cancer (OR = 1.26 [95% CI = 1.04–1.51]) irrespective of smoking status.⁹⁶

The glutathione S-transferase *GSTT1 null genotype* when combined with other genomic alterations (particularly with *CYP1A1* variations), may confer an increased risk of lung cancer in never smokers (OR = 4.67 [95% CI = 2.00–10.9]).^{95,97}

Polymorphisms of genes involved in DNA repair has focused on genomic polymorphisms implicated in base repair (*XRCCI*, *OGGI*), nucleotide repair (*ERCCI* and *ERCC2*), double-strand break repair (*XRCC3*) and mismatch repair (*MLH1*, *MSH2*).³ In 2003 Zhou et al.

Table 2

Principal genomic polymorphisms associated with a risk of lung cancer in never smokers.

Pathway	Gene	Protein	Studied polymorphism	OR (95% confidence interval)	Comments	Ref.
Carcinogenic metabolism (polycyclic aromatic hydrocarbons, nitroaromatics, arylamines)	<i>CYP1A1</i>	Enzyme involved in early (phase 1) metabolism steps	T3801C (MspI)	NS	Role in hormone-dependent cancers?	95
			A2455G (Ile462Val)	2.21 [1.12–4.37]		95
	<i>GSTM1</i>	Enzyme involved in late (phase 2) metabolism steps (conjugation)	Null genotype	NS	If associated with the Ile462Val polymorphism of <i>CYP1A1</i> , OR = 4.67 [2.00–10.9]. Role in cancers before the age of 50?	95 148
DNA repair	<i>NQO1</i>	Phase 1 and 2 enzyme	Pro187Ser	NS		149
	<i>XRCC1</i>	DNA base repair enzyme	Arg399Gln	2.4 [1.2–5.0]	Protective factor in 'heavy' smokers (relation dose / odds ratio) Expression differential increased in the presence of <i>ERCC2</i> Asp312Asn and Lys751Gln polymorphisms	98
	<i>ERCC2 (XPD)</i>	Nucleotide repair enzyme	Lys751Gln and Asp312Asn	NS		101
	<i>MLH1</i>	Mismatch repair enzyme	GG Genotype	1.64 [1.10–2.44]	Role in cancers caused by exposure to environmental tobacco smoke?	103 150
Inflammation pathways	<i>IL10</i>	Inflammation mediator	TT genotype of rs1800871	2.5 [1.3–5.1]		107
	<i>TNF</i>		CC genotype of rs1799964	0.36 [0.17–0.77]		107
	<i>IL1-β-31T/C</i>		TT genotype	2.24 [1.15–4.38]	If associated with atopy, asthma, chronic cough	108
	<i>IL1-RN</i>		Allele *2 VNTR	5.09 [1.39–18.67]		108
	<i>IL6</i>		Allele 634 G	1.44 [1.07–1.94]		108

reported that the Arg399Gln polymorphism of *XRCC1* was associated with increase in lung cancer risk (OR = 1.3 [95% CI = 1.0–1.8]). The OR increased as the number of pack-years decreased, suggesting that the polymorphism represented a risk factor for never smokers (OR = 2.4 [95% CI = 1.2–5.0]) while providing a protective effect for 'heavy' smokers (OR = 0.5 [95% CI = 0.3–1.0]). Their observations may suggest an upregulating effect on the promoter of the *XRCC1* Arg399Gln variant by tobacco carcinogens (a sort of 'enzymatic induction') favouring DNA lesion repair. This expression differential may also be augmented by the presence of the Asp312Asn (exon 10) and Lys751Gln (exon 23) polymorphisms of *ERCC2 (XPD)*.⁹⁸ The Arg399Gln allele of *XRCC1* associated with an epidermal growth factor receptor (*EGFR*) mutation and response to gefitinib in never smokers has been disputed,^{99–101} suggesting that the initial efforts may not have been sufficiently dimensioned. The *ERCC2*, Lys751Gln polymorphism is associated with increased lung cancer risk in ever smokers only. The *ERCC2* Asp312Asn polymorphism however is associated with increased risk in ever smokers

in some studies and in never smokers in others.^{102,103} Lo et al. recently detected an abnormality in the promoter of *MLH1* that appeared to be associated with lung cancer risk, in GG genotype never smokers (OR = 1.64 [95% CI = 1.10–2.44]). Furthermore, those authors found an association between *MLH1* and passive smoking, with risks appearing to increase as ETS exposure increases. Conversely, they found no associations for *MSH2* polymorphisms.¹⁰⁴ Great caution is needed in interpreting these results because of the small number of study subjects. Other authors have reported that individual DNA repair capacities may be measurable using blood tests. In a cohort of never smokers, Gorlova et al. showed that suboptimal levels of DNA repair capacity resulted in elevated lung cancer risks (OR = 1.92 [95% CI = 1.3–2.9]), particularly in patients exposed to ETS and those with a family history of lung cancer.¹⁰⁵ Finally, the expression of DNA repair proteins, notably those of nucleotide excision repair, appears to differ in ever-smoker and never-smoker cancers.¹⁰⁶

More recently, a number of authors have begun exploring genes involved in inflammatory responses.

Among these, the TT rs800871 polymorphism of the *IL10* gene may be associated with an increased risk in never smokers, whereas the CC rs179964 polymorphism of *TNF* may confer a protective effect.¹⁰⁷ The authors of another report illustrated a novel link between chronic inflammatory lung disorders (tuberculosis, atopy, asthma, chronic productive cough), polymorphisms of inflammation genes and the risk of lung cancer. They found that risk increases when at least one of these conditions is present and accompanied by certain polymorphisms of *IL1* or *IL-6*¹⁰⁸ suggesting a role for chronic inflammation in LCINS. Inflammation has been clearly linked to other malignancies such as colorectal cancer. One cannot help but see similarities between the predominantly transition-type mutations (in particular for *p53* and *RAS*) seen in these other cancers and those observed in LCINS, giving credence to the ‘inflammatory hypothesis’ of carcinogenesis.

4.2. High speed genomic studies

More recently, automated exploratory techniques have enabled genomic polymorphism studies using ultra high speed DNA chips to analyse nucleic acids taken from lymphocytes to find single nucleotide polymorphisms (SNP).¹⁰⁹ This approach has permitted the identification of several loci where variants are associated with a risk of lung cancer.^{110–115}

5p15.33: comprises the genes *CLPTMIL* and *hTERT*. This locus may be directly associated with a

risk of lung cancer in Asian never-smoker women.^{116,117} The implication of an *hTERT* gene polymorphism is interesting because loss of telomerase activity in adult somatic cells results in cellular and organism ageing. Normal telomerase regulation is important for the homeostasis of adult tissues (avoiding the emergence of cancerous cells). Conversely, malignant cells re-express telomerase in more than 80% of cases. In a recent work comparing 229 lung cancer cases with controls, Shen et al. demonstrated that the association of telomere length and lung cancer risk was particularly significant in ever smokers.¹¹⁸

13q31.3: is the most recent locus to be associated with lung cancer. The association of variants in this locus with lung cancer was initially reported in the first genome-wide study carried out specifically in a population of never smokers, with an OR of 1.46 (95% CI = 1.26–1.70).¹¹⁹ The detected variant, rs2352028, was situated in *GPC5*, whose expression is down-regulated in adenocarcinomas. *GPC5* is implicated in FGF signalling pathways. A second larger study failed to confirm the findings.¹²⁰ Ahn et al. recently identified a lung cancer susceptibility locus in a small number of Korean never smokers at 18p11.22.¹²¹

4.3. Chromosome aberrations

Chromosome aberrations, e.g. loss of heterozygosity or allelic alterations, are frequently found in all cancers. Several recent studies have illustrated differences in the

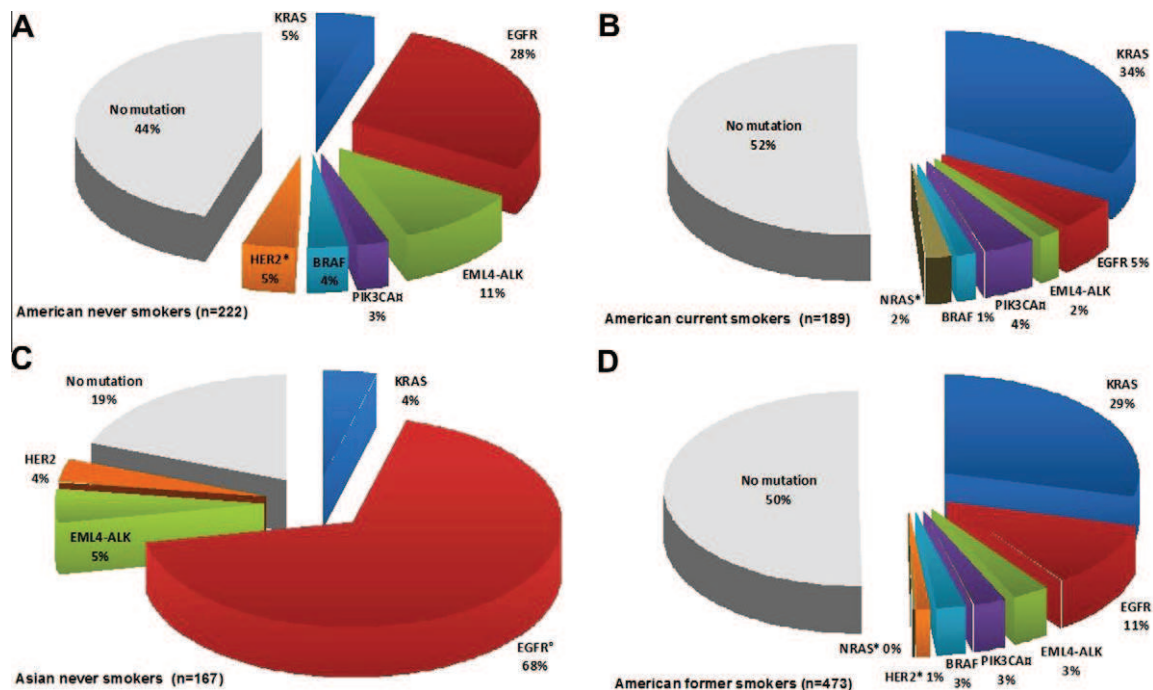


Fig. 1. Pooled data from several studies on biomarker mutations according to smoking status in American (A, B and D) and Asian (C) patients (Adapted from Ref.7,40,145,146). *HER2 is not tested in Sequist's study¹⁴⁵ and NRAS is not tested in Ortiz's series¹⁴⁶ – includes 4/28 concurrent PIK3CA/EGFR mutations and 7/28 concurrent PIK3CA/KRAS mutations – includes four concurrent EGFR/PIK3CA mutations in Sun's study.⁷

frequency and type of chromosome aberrations found in ever smokers and never smokers – overall chromosome aberrations are more frequent in ever smokers.¹²²

5. Acquired molecular abnormalities – gene-environment interaction

5.1. Somatic mutations (Fig. 1)

5.1.1. *p53* mutations

There is a linear relation between *p53* mutation risk and tobacco consumption¹²³; mutations are thus rarer in never smokers (10–47%) than in ever smokers (26–71%).¹²⁴ Additionally, the spectrum and type of mutation differ according to smoking status: G to T transversions are more frequently found in ever smokers, whereas G to A transitions and G to C transversions are more common in never smokers.^{123,124} Finally, it is interesting to note that *p53* mutations are more frequent in never-smoker patients exposed to ETS than in those not exposed to ETS.^{125,126}

5.1.2. *EGFR* family mutations

These mutations are found more frequently in women, particularly Asian women, with adenocarcinoma and especially never smoker status.^{7,127} Fig. 1 shows that the frequency of *EGFR* mutations varies across groups and subgroups, from a low of 5% in American current smokers, to 28% in American never smokers and on to a high of 68% in Asian never smokers. Interestingly, the frequency of *EGFR* mutations has been shown to be inversely proportional to exposure to ETS in never smokers.³⁷ Together, these data place *EGFR* mutation as the first molecular biomarker specific to LCINS.^{3,122}

HER2 is another member of the *EGFR* family that is overexpressed in 10 to 20% of non-small cell lung cancer (NSCLC).^{128,129} Mutations are found in the *ErbB2* functional kinase domain in approximately 2% of cases of NSCLC. They appear to be significantly more frequent in adenocarcinomas, never smokers and women.

5.1.3. *KRAS* mutations

KRAS mutations are found in 20–30% of NSCLC cases, predominately in adenocarcinomas. Conversely, it is now widely agreed upon that *KRAS* mutations are much more frequently encountered in ever smokers,^{3,122,130,131} although they may be found in never smokers as well (0–15% of adenocarcinomas).¹³² However, as is the case for *p53*, the mutational profile appears to differ greatly according to smoking status: G to T transversions are more common in ever smokers,¹²³ whereas G to A transitions are seen more frequently in never smokers.¹³³ *KRAS* and *EGFR* mutations are generally mutually exclusive,¹³⁴ underlining their ordered participation in a intracellular signalisation pathway,

and suggesting different oncogenic mechanisms in lung cancer as a function of smoking status: tobacco carcinogens seem to be directly responsible for *KRAS* mutations, whereas the cause of mutations in *EGFR*, found particularly in never smokers, is currently not clear.³

5.1.4. *ALK* rearrangements

The tyrosine kinase anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) is not normally expressed in pulmonary tissue. *EML4-ALK* is present in 3–11% of NSCLC and is more frequent in adenocarcinomas of never smokers (Fig. 1). It has been found to be usually mutually exclusive of *EGFR* and *KRAS* mutations, suggesting *ALK* involvement downstream of *EGFR* and *KRAS* in the signalling pathway. Conversely *EML4-ALK* may be associated with *p53* mutations.^{135–138}

5.1.5. Other molecular abnormalities

Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K family) is an enzyme that is activated by tyrosine kinase membrane receptors and involved in intracellular signalling pathways. The mutant gene is detected mainly in adenocarcinomas and in ever smokers.¹³⁹

The GTPase of RAS is bound preferentially by the kinase B-RAF. This latter then initiates the phosphorylation cascade of MAP kinases. In NSCLC, the frequency of *B-RAF* mutations is 1–3%.^{122,140,141} These mutations have been reported only in adenocarcinomas. A recent study concluded that B-RAF mutations may occur with much greater frequency in ever smokers,¹⁴² but the pooled data in Fig. 1 suggest the opposite, i.e. a greater frequency in never smokers.

Protein kinase B is activated by PI3K in the cell survival (anti-apoptotic) regulatory pathway. Protein kinase B is coded by the *AKT* gene, where mutations are reported in 1% of NSCLC, most frequently in squamous cell lung carcinomas in Caucasian populations. To date, no difference according to smoking status has been reported.¹⁴⁰

MEK1 (or MAPKK1) is a kinase involved in the signalling cascade downstream of BRAF (MAP kinases cascade). Approximately 1% of NSCLC present *MEK1* mutation, only in adenocarcinomas. A difference in frequency as a function of smoking status has not been reported.¹²²

Finally, *LKB1* is a tumour suppressor gene. Its mutations occur with greater frequency in adenocarcinomas, especially in ever smokers.^{122,143}

5.2. Epigenetic abnormalities

A number of epigenetic mutations have also been shown to be associated with lung cancer. The most widely studied is cytosine hypermethylation in the promoters of certain genes. Cytosine hypermethylation is the mechanism the most frequently implicated in altered

genetic expression in lung cancer, and appears furthermore to be dependent on smoking status. Methylation in the promoters of *RASSF2*, *TNFRSF10C*, *BHLHB5* and *BOLL* is more frequent in never smokers.¹⁴⁴

6. Conclusion

Lung cancer in never smokers is a distinct medical entity that is more frequent in women than in men and in certain geographical regions than in others (Asia > North America > Europe). Pollution (including environmental tobacco smoke and occupational exposure) is an important factor in this population. Close to 50% of never-smoker patients present molecular mutations that may be treatable currently or in the near future via targeted therapies compared to potentially 10% of ever smokers.

The genomic and molecular particularities support the definition of lung cancer in never smokers as a distinct medical entity.

Conflict of interest statement

SC declares having received grants, paid to his institution from: Roche SA France, Pfizer, Boehringer Ingelheim, Pierre Fabre, Astra Zeneca and Lilly. GZ declares having received grants, paid to his institution from Lilly and supports for travel to meeting from Lilly. FM: None declared. BM: None declared. PJS: None declared.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2012.03.007>.

References

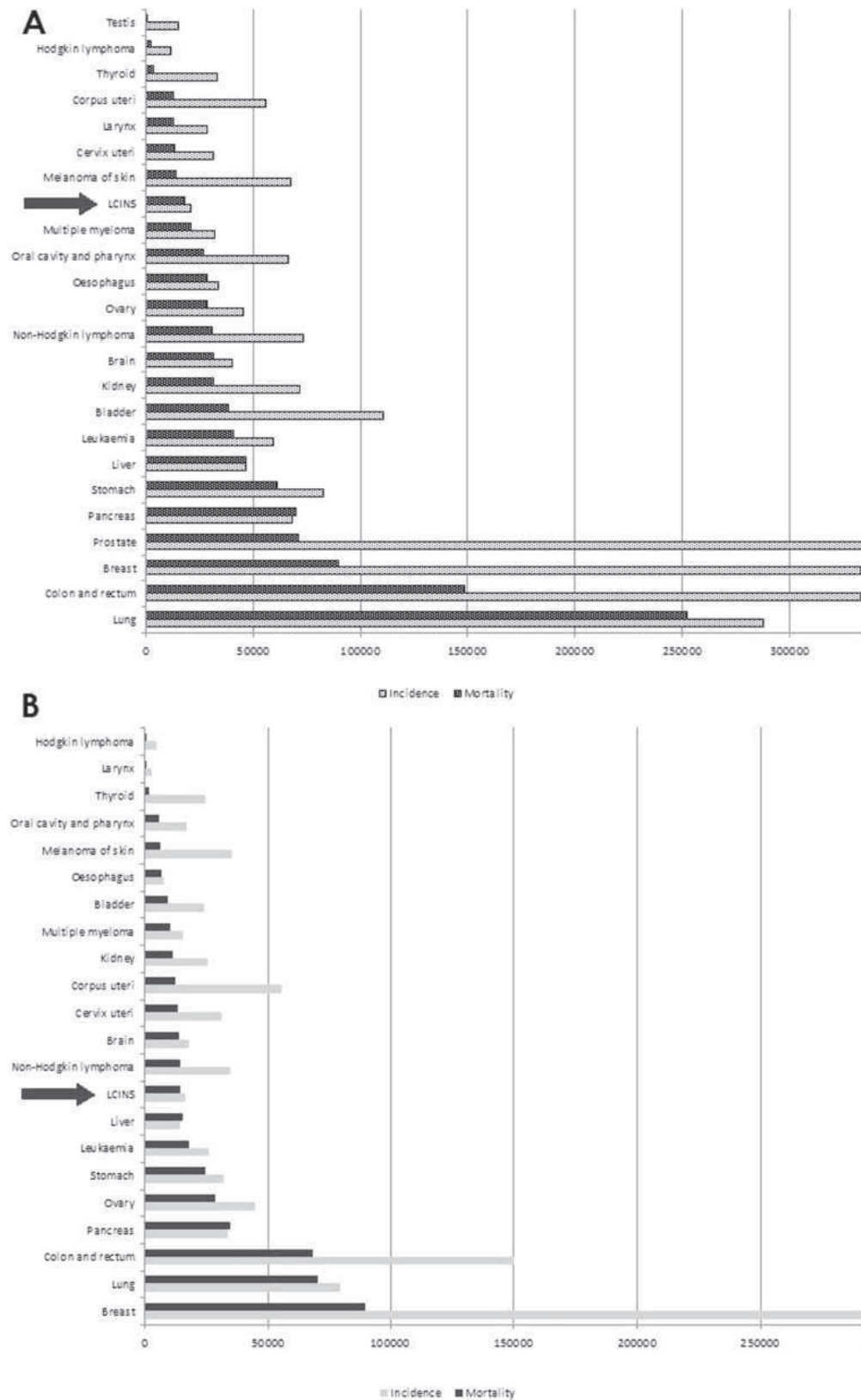
- Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *Br Med J* 1950;**2**(4682):739–48.
- Khuder SA. Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer* 2001 Mar;**31**(2–3):139–48.
- Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers – a different disease. *Nat Rev Cancer* 2007 Oct;**7**(10):778–90.
- Toh C-K, Gao F, Lim W-T, et al. Never-smokers with lung cancer: epidemiologic evidence of a distinct disease entity. *J Clin Oncol* 2006;**24**(15):2245–51.
- Yano T, Miura N, Takenaka T, et al. Never-smoking non-small cell lung cancer as a separate entity: clinicopathologic features and survival. *Cancer* 2008;**113**(5):1012–8.
- Govindan R. Lung cancer in never smokers: a new hot area of research. *Lancet Oncol* 2010;**11**(4):304–5.
- Sun Y, Ren Y, Fang Z, et al. Lung adenocarcinoma from East Asian never-smokers is a disease largely defined by targetable oncogenic mutant kinases. *J Clin Oncol* 2010;**28**(30):4616–20.
- Scagliotti GV, Longo M, Novello S. Non-small cell lung cancer in never smokers. *Curr Opin Oncol* 2009;**21**(2):99–104.
- Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009 Sep 3;**361**(10):947–57.
- Boffetta P, Järnholm B, Brennan P, Nyrén O. Incidence of lung cancer in a large cohort of non-smoking men from Sweden. *Int J Cancer* 2001;**94**(4):591–3.
- Forastiere F, Perucci CA, Arcà M, Axelson O. Indirect estimates of lung cancer death rates in Italy not attributable to active smoking. *Epidemiology* 1993;**4**(6):502–10.
- Enstrom JE. Rising lung cancer mortality among nonsmokers. *J Natl Cancer Inst* 1979;**62**(4):755–60.
- Thun MJ, Hannan LM, Adams-Campbell LL, et al. Lung cancer occurrence in never-smokers: an analysis of 13 cohorts and 22 cancer registry studies. *PLoS Med* 2008;**5**(9):e185.
- Thun MJ, Henley SJ, Burns D, et al. Lung cancer death rates in lifelong nonsmokers. *J Natl Cancer Inst* 2006;**98**(10):691–9.
- Quoix E. Novel epidemiology in lung cancer - non-smokers, women and cannabis. *Rev Mal Respir* 2007;**24**(8 Pt 2), 6S10–6S15.
- Han Y-Y, Davis DL, Weissfeld JL, Dinse GE. Generational risks for cancers not related to tobacco, screening, or treatment in the United States. *Cancer* 2010;**116**(4):940–8.
- Ferlay J, Shin H-R, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;**127**(12):2893–917.
- Subramanian J, Govindan R. Lung cancer in never smokers: a review. *J Clin Oncol* 2007;**25**(5):561–70.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;**55**(2):74–108.
- Blair A, Freeman LB. Lung cancer among nonsmokers. *Epidemiology* 2006;**17**(6):601–3.
- Foeglé J, Hédelin G, Lebitasy M-P, et al. Specific features of non-small cell lung cancer in women: a retrospective study of 1738 cases diagnosed in Bas-Rhin between 1982 and 1997. *J Thorac Oncol* 2007;**2**(6):466–74.
- Blanchon F, Grivaux M, Collon T, et al. Epidemiologic of primary bronchial carcinoma management in the general French hospital centers. *Rev Mal Respir* 2002;**19**(6):727–34.
- Hospices civils de Lyon/Institut de veille sanitaire/Institut national du cancer/Francim/Institut national de la santé et de la recherche médicale. Projections de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2011. www.invs.sante.fr. Available from: <<http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-chroniques-et-traumatismes/Cancers/Surveillance-epidemiologique-des-cancers/Projections-Estimations-de-l-incidence-et-de-la-mortalite/Projections-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-France-en-2011>>; 2011 [accessed 2.12.2012].
- European Cancer Observatory. Cancer: Lung. Estimated incidence and mortality: men and women. European Cancer Observatory. Available from: <<http://eu-cancer.iarc.fr/>>, 2008 [Internet].
- Radzikowska E, Głaz P, Roszkowski K. Lung cancer in women: age, smoking, histology, performance status, stage, initial treatment and survival. Population-based study of 20,561 cases. *Ann Oncol* 2002;**13**(7):1087–93.
- Quoix E, Monnet I, Scheid P, et al. Management and outcome of French elderly patients with lung cancer: an IFCT survey. *Rev Mal Respir* 2010;**27**(5):421–30.
- Kawaguchi T, Takada M, Kubo A, et al. Gender, histology, and time of diagnosis are important factors for prognosis: analysis of 1499 never-smokers with advanced non-small cell lung cancer in Japan. *J Thorac Oncol* 2010;**5**(7):1011–7.
- Antony GK, Bertino E, Franklin M, Otterson GA, Dudek AZ. Small cell lung cancer in never smokers: report of two cases. *J Thorac Oncol* 2010;**5**(5):747–8.
- Samet JM, Avila-Tang E, Boffetta P, et al. Lung cancer in never smokers: clinical epidemiology and environmental risk factors. *Clin Cancer Res* 2009;**15**(18):5626–45.
- Clément-Duchêne C, Vignaud J-M, Stoufflet A, et al. Characteristics of never smoker lung cancer including environmental and occupational risk factors. *Lung Cancer* 2010;**67**(2):144–50.

31. Trédaniel J, Boffetta P, Saracci R, Hirsch A. Exposure to environmental tobacco smoke and risk of lung cancer: the epidemiological evidence. *Eur Respir J* 1994;**7**(10):1877–88.
32. Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ* 1997;**315**(7114):980–8.
33. Vineis P, Airolidi L, Veglia F, et al. Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study. *BMJ* 2005;**330**(7486):277.
34. Vineis P, Hoek G, Krzyzanowski M, et al. Lung cancers attributable to environmental tobacco smoke and air pollution in non-smokers in different European countries: a prospective study. *Environ Health* 2007;**6**:7.
35. Johnson KC, Hu J, Mao Y. Lifetime residential and workplace exposure to environmental tobacco smoke and lung cancer in never-smoking women, Canada 1994–97. *Int J Cancer* 2001;**93**(6):902–6.
36. Oberg M, Jaakkola MS, Woodward A, Peruga A, Prüss-Ustün A. Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. *Lancet* 2011;**377**(9760):139–46.
37. Lee YJ, Cho BC, Jee SH, et al. Impact of environmental tobacco smoke on the incidence of mutations in epidermal growth factor receptor gene in never-smoker patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010;**28**(3):487–92.
38. Flom JD, Ferris JS, Liao Y, et al. Prenatal smoke exposure and genomic DNA methylation in a multiethnic birth cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;**20**(12):2518–23.
39. Thomas JL, Guo H, Carmella SG, et al. Metabolites of a tobacco-specific lung carcinogen in children exposed to second-hand or thirdhand tobacco smoke in their homes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;**20**(6):1213–21.
40. Suda K, Tomizawa K, Matsuo K, Yatabe Y, Mitsudomi T, Nagoya J. Analyses of mutually exclusive driver mutations in lung adenocarcinomas from never-smoking patients. Amsterdam, 2011.
41. Couraud S, Fournel P, Moro-Sibilot D, Pérol M, Souquet P-J. Professional practice and accessibility to equipment in thoracic oncology. Results of a survey in Rhône-Alpes region (France). *Bull Cancer*. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21659060>>; 2011 Jun 9 [accessed 12.02.2012].
42. Travis W, Brambilla E, Muller-Hermelink H, Harris C, editors. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. Lyon: IARC Press; 2004.
43. Olsson AC, Gustavsson P, Kromhout H, et al. Exposure to diesel motor exhaust and lung cancer risk in a pooled analysis from case-control studies in Europe and Canada. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;**183**(7):941–8.
44. Stabile LP, Dacic S, Land SR, et al. Combined analysis of estrogen receptor beta-1 and progesterone receptor expression identifies lung cancer patients with poor outcome. *Clin Cancer Res* 2011;**17**(1):154–64.
45. Rades D, Setter C, Dahl O, Schild SE, Noack F. The prognostic impact of tumor cell expression of estrogen receptor- α , progesterone receptor, and androgen receptor in patients irradiated for nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2012;**118**(1):157–63.
46. Omoto Y, Kobayashi Y, Nishida K, et al. Expression, function, and clinical implications of the estrogen receptor beta in human lung cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;**285**(2):340–7.
47. Wu C-T, Chang Y-L, Shih J-Y, Lee Y-C. The significance of estrogen receptor beta in 301 surgically treated non-small cell lung cancers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;**130**(4):979–86.
48. Ali G, Donati V, Loggini B, et al. Different estrogen receptor beta expression in distinct histologic subtypes of lung adenocarcinoma. *Hum Pathol* 2008;**39**(10):1465–73.
49. Nose N, Uramoto H, Iwata T, Hanagiri T, Yasumoto K. Expression of estrogen receptor beta predicts a clinical response and longer progression-free survival after treatment with EGFR-TKI for adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2011;**71**(3):350–5.
50. Paulus JK, Zhou W, Kraft P, et al. Haplotypes of estrogen receptor-beta and risk of non-small cell lung cancer in women. *Lung Cancer* 2011;**71**(3):258–63.
51. Clague J, Reynolds P, Sullivan-Halley J, et al. Menopausal hormone therapy does not influence lung cancer risk: results from the California Teachers Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;**20**(3):560–4.
52. Baik CS, Strauss GM, Speizer FE, Feskanich D. Reproductive factors, hormone use, and risk for lung cancer in postmenopausal women, the Nurses' Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;**19**(10):2525–33.
53. Slatore CG, Chien JW, Au DH, Satia JA, White E. Lung cancer and hormone replacement therapy: association in the vitamins and lifestyle study. *J Clin Oncol* 2010;**28**(9):1540–6.
54. Kabat GC, Miller AB, Rohan TE. Reproductive and hormonal factors and risk of lung cancer in women: a prospective cohort study. *Int J Cancer* 2007;**120**(10):2214–20.
55. Chlebowski RT, Schwartz AG, Wakelee H, et al. Oestrogen plus progestin and lung cancer in postmenopausal women (Women's Health Initiative trial): a post-hoc analysis of a randomised controlled trial. *Lancet* 2009;**374**(9697):1243–51.
56. Hulley S, Furberg C, Barrett-Connor E, et al. Noncardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: heart and estrogen/progestin replacement study follow-up (HERS II). *JAMA* 2002;**288**(1):58–66.
57. Greiser CM, Greiser EM, Dören M. Menopausal hormone therapy and risk of lung cancer-Systematic review and meta-analysis. *Maturitas* 2010;**65**(3):198–204.
58. Brinton LA, Gierach GL, Andaya A, et al. Reproductive and hormonal factors and lung cancer risk in the NIH-AARP Diet and Health Study cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;**20**(5):900–11.
59. Bouchardy C, Benhamou S, Schaffar R, et al. Lung cancer mortality risk among breast cancer patients treated with anti-estrogens. *Cancer* 2011;**117**(6):1288–95.
60. Amabile J-C, Leuraud K, Vacquier B, et al. Multifactorial study of the risk of lung cancer among French uranium miners: radon, smoking and silicosis. *Health Phys* 2009;**97**(6):613–21.
61. 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**(7485):223.
62. Turner MC, Krewski D, Chen Y, et al. Radon and lung cancer in the American Cancer Society cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;**20**(3):438–48.
63. Trédaniel J, Aarab-Terrisse S, Teixeira L, et al. Atmospheric air pollution and lung cancer: epidemiologic data. *Rev Mal Respir* 2009;**26**(4):437–45 [quiz 481, 484].
64. Vineis P, Forastiere F, Hoek G, Lipsett M. Outdoor air pollution and lung cancer: recent epidemiologic evidence. *Int J Cancer* 2004;**111**(5):647–52.
65. Gallus S, Negri E, Boffetta P, et al. European studies on long-term exposure to ambient particulate matter and lung cancer. *Eur J Cancer Prev* 2008;**17**(3):191–4.
66. Katanoda K, Sobue T, Satoh H, et al. An association between long-term exposure to ambient air pollution and mortality from lung cancer and respiratory diseases in Japan. *J Epidemiol* 2011;**21**(2):132–43.
67. Zhao Y, Wang S, Aunan K, Seip HM, Hao J. Air pollution and lung cancer risks in China – a meta-analysis. *Sci Total Environ* 2006;**366**(2–3):500–13.
68. Lee K-M, Chapman RS, Shen M, et al. Differential effects of smoking on lung cancer mortality before and after household

- stove improvement in Xuanwei, China. *Br J Cancer* 2010;**103**(5):727–9.
69. Mumford JL, Helmes CT, Lee XM, Seidenberg J, Nesnow S. Mouse skin tumorigenicity studies of indoor coal and wood combustion emissions from homes of residents in Xuan Wei, China with high lung cancer mortality. *Carcinogenesis* 1990;**11**(3):397–403.
70. Lissowska J, Bardin-Mikolajczak A, Fletcher T, et al. Lung cancer and indoor pollution from heating and cooking with solid fuels: the IARC international multicentre case-control study in Eastern/Central Europe and the United Kingdom. *Am J Epidemiol* 2005;**162**(4):326–33.
71. Cheng YW, Chiou HL, Sheu GT, et al. The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. *Cancer Res* 2001;**61**(7):2799–803.
72. Koshiol J, Rotunno M, Gillison ML, et al. Assessment of human papillomavirus in lung tumor tissue. *J Natl Cancer Inst* 2011;**103**(6):501–7.
73. Liang H-Y, Li X-L, Yu X-S, et al. Facts and fiction of the relationship between preexisting tuberculosis and lung cancer risk: a systematic review. *Int J Cancer* 2009;**125**(12):2936–44.
74. Yu Y-H, Liao C-C, Hsu W-H, et al. Increased lung cancer risk among patients with pulmonary tuberculosis: a population cohort study. *J Thorac Oncol* 2011;**6**(1):32–7.
75. Shiels MS, Albanes D, Virtamo J, Engels EA. Increased risk of lung cancer in men with tuberculosis in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;**20**(4):672–8.
76. Luo Y-H, Wu C-H, Wu W-S, et al. Association between tumor epidermal growth factor receptor mutation and pulmonary tuberculosis in patients with adenocarcinoma of the lungs. *J Thorac Oncol* 2012;**7**(2):299–305.
77. Sidorchuk A, Agardh EE, Aremu O, et al. Socioeconomic differences in lung cancer incidence: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes Control* 2009;**20**(4):459–71.
78. Booth CM, Li G, Zhang-Salomons J, Mackillop WJ. The impact of socioeconomic status on stage of cancer at diagnosis and survival: a population-based study in Ontario, Canada. *Cancer* 2010;**116**(17):4160–7.
79. Hardy D, Chan W, Liu C-C, et al. Racial disparities in the use of hospice services according to geographic residence and socioeconomic status in an elderly cohort with nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2011;**117**(7):1506–15.
80. Littman AJ, Thornquist MD, White E, et al. Prior lung disease and risk of lung cancer in a large prospective study. *Cancer Causes Control* 2004;**15**(8):819–27.
81. Brenner DR, McLaughlin JR, Hung RJ. Previous lung diseases and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2011;**6**(3):e17479.
82. G  n  b  s C, Brouchet L, Kamar N, et al. Characteristics of thoracic malignancies that occur after solid-organ transplantation. *J Thorac Oncol* 2010;**5**(11):1789–95.
83. Berman K, Tandra S, Vuppalanchi R, et al. Hepatic and extrahepatic cancer in cirrhosis: a longitudinal cohort study. *Am J Gastroenterol* 2011;**106**(5):899–906.
84. Milano MT, Li H, Constine LS, Travis LB. Survival after second primary lung cancer: a population-based study of 187 Hodgkin lymphoma patients. *Cancer* 2011;**117**(24):5538–47.
85. Miller AB, Altenburg H-P, Bueno-de-Mesquita B, et al. Fruits and vegetables and lung cancer: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer* 2004;**108**(2):269–76.
86. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, et al. Alcohol consumption and lung cancer risk in never smokers: a meta-analysis. *Ann Oncol* 2011;**22**(12):2631–9.
87. Gorlova OY, Weng S-F, Hernandez L, Spitz MR, Forman MR. Dietary patterns affect lung cancer risk in never smokers. *Nutr Cancer* 2011;**63**(6):842–9.
88. Lee M-Y, Lin K-D, Hsiao P-J, Shin S-J. The association of diabetes mellitus with liver, colon, lung, and prostate cancer is independent of hypertension, hyperlipidemia, and gout in Taiwanese patients. *Metab Clin Exp* 2012;**61**(2):242–9.
89. Chiou W, Huang B, Chou W, Weng H, Lin J. Incidences of cancers in diabetic and non-diabetic hospitalized adult patients in Taiwan. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2011;**12**(6):1577–81.
90. Carstensen B, Witte D, Friis S. Cancer occurrence in Danish diabetic patients: duration and insulin effects. Carstensen B, Witte DR, Friis S. *Diabetologia*. 2011 Nov 27.
91. Varlotto J, Medford-Davis LN, Recht A, et al. Confirmation of the role of diabetes in the local recurrence of surgically resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2012;**75**(3):381–90.
92. Currie CJ, Poole CD, Jenkins-Jones S, et al. Mortality after incident cancer in people with and without type 2 diabetes: impact of metformin on survival. *Diabetes Care* 2012;**35**(2):299–304.
93. Hatlen P, Gr  nberg BH, Langhammer A, Carlsen SM, Amundsen T. Prolonged survival in patients with lung cancer with diabetes mellitus. *J Thorac Oncol* 2011;**6**(11):1810–7.
94. Chen Z, Li Z, Niu X, et al. The effect of CYP1A1 polymorphisms on the risk of lung cancer: a global meta-analysis based on 71 case-control studies. *Mutagenesis* 2011;**26**(3):437–46.
95. Hung RJ, Boffetta P, Brockm  ller J, et al. CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian non-smokers: a pooled analysis. *Carcinogenesis* 2003;**24**(5):875–82.
96. Chen B, Qiu L-X, Li Y, et al. The CYP1B1 Leu432Val polymorphism contributes to lung cancer risk: evidence from 6501 subjects. *Lung Cancer* 2010;**70**(3):247–52.
97. Jin Y, Xu H, Zhang C, et al. Combined effects of cigarette smoking, gene polymorphisms and methylations of tumor suppressor genes on non small cell lung cancer: a hospital-based case-control study in China. *BMC Cancer* 2010;**10**:422.
98. Zhou W, Liu G, Miller DP, et al. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2, smoking, and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;**12**(4):359–65.
99. Han J-Y, Yoon K-A, Park JH, et al. DNA repair gene polymorphisms and benefit from gefitinib in never-smokers with lung adenocarcinoma. *Cancer* 2011;**117**(14):3201–8.
100. 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**(11):3081–9.
101. Kiyohara C, Takayama K, Nakanishi Y. Lung cancer risk and genetic polymorphisms in DNA repair pathways: a meta-analysis. *J Nucleic Acids* 2010;**2010**:701760.
102. Zhan P, Wang Q, Wei S-Z, et al. ERCC2/XPD Lys751Gln and Asp312Asn gene polymorphism and lung cancer risk: a meta-analysis involving 22 case-control studies. *J Thorac Oncol* 2010;**5**(9):1337–45.
103. Qian B, Zhang H, Zhang L, et al. Association of genetic polymorphisms in DNA repair pathway genes with non-small cell lung cancer risk. *Lung Cancer* 2011;**73**(2):138–46.
104. Lo Y-L, Hsiao C-F, Jou Y-S, et al. Polymorphisms of MLH1 and MSH2 genes and the risk of lung cancer among never smokers. *Lung Cancer* 2011;**72**(3):280–6.
105. Gorlova OY, Weng S-F, Zhang Y, et al. DNA repair capacity and lung cancer risk in never smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;**17**(6):1322–8.
106. Planchard D, Domont J, Taranchon E, et al. The NER proteins are differentially expressed in ever smokers and in never smokers with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol* 2009;**20**(7):1257–63.
107. Oh SS, Chang S-C, Cai L, et al. Single nucleotide polymorphisms of 8 inflammation-related genes and their associations with smoking-related cancers. *Int J Cancer* 2010;**127**(9):2169–82.

108. Lim W-Y, 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**(4):522–9.
109. Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med* 2010;**363**(2):166–76.
110. 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**(5):616–22.
111. Kaur-Knudsen D, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Nicotinic acetylcholine receptor polymorphism, smoking behavior, and tobacco-related cancer and lung and cardiovascular diseases: a cohort study. *J Clin Oncol* 2011;**29**(21):2875–82.
112. Wang Y, Broderick P, Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Chromosome 15q25 (CHRNA3-CHRNA5) variation impacts indirectly on lung cancer risk. *PLoS One* 2011;**6**(4):e19085.
113. McKay JD, Hung RJ, Gaborieau V, et al. Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33. *Nat Genet* 2008;**40**(12):1404–6.
114. Amos CI, Pinney SM, Li Y, et al. A susceptibility locus on chromosome 6q greatly increases lung cancer risk among light and never smokers. *Cancer Res* 2010;**70**(6):2359–67.
115. You M, Wang D, Liu P, et al. Fine mapping of chromosome 6q23–25 region in familial lung cancer families reveals RGS17 as a likely candidate gene. *Clin Cancer Res* 2009;**15**(8):2666–74.
116. 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**(5):679–91.
117. Hsiung CA, Lan Q, Hong Y-C, et al. The 5p15.33 locus is associated with risk of lung adenocarcinoma in never-smoking females in Asia. *PLoS Genet* 2010;**6**(8). Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20700438>> [accessed 12.02.2012].
118. Shen M, Cawthon R, Rothman N, et al. A prospective study of telomere length measured by monochrome multiplex quantitative PCR and risk of lung cancer. *Lung Cancer* 2011;**73**(2):133–7.
119. Li Y, Sheu C-C, Ye Y, et al. Genetic variants and risk of lung cancer in never smokers: a genome-wide association study. *Lancet Oncol* 2010;**11**(4):321–30.
120. Landi MT, Chatterjee N, Caporaso NE, et al. GPC5 rs2352028 variant and risk of lung cancer in never smokers. *Lancet Oncol* 2010;**11**(8):714–6 [author reply 716].
121. Ahn M-J, Won H-H, Lee J, Lee S-T, Sun J-M, Park YH, et al. The 18p11.22 locus is associated with never smoker non-small cell lung cancer susceptibility in Korean populations. *Hum Genet*. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21866343>>; 2011 Aug 25 [accessed 12.02.2012].
122. Subramanian J, Govindan R. Molecular genetics of lung cancer in people who have never smoked. *Lancet Oncol* 2008;**9**(7):676–82.
123. Le Calvez F, Mukeria A, Hunt JD, et al. TP53 and KRAS mutation load and types in lung cancers in relation to tobacco smoke: distinct patterns in never, former, and current smokers. *Cancer Res* 2005;**65**(12):5076–83.
124. Hernandez-Boussard TM, Hainaut P. A specific spectrum of p53 mutations in lung cancer from smokers: review of mutations compiled in the IARC p53 database. *Environ Health Perspect* 1998;**106**(7):385–91.
125. Husgafvel-Pursiainen K, Boffetta P, Kannio A, et al. P53 mutations and exposure to environmental tobacco smoke in a multicenter study on lung cancer. *Cancer Res* 2000;**60**(11):2906–11.
126. Lee YJ, Kim J-H, Kim SK, et al. Lung cancer in never smokers: change of a mindset in the molecular era. *Lung Cancer* 2011;**72**(1):9–15.
127. Shigematsu H, Gazdar AF. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int J Cancer* 2006;**118**(2):257–62.
128. Shigematsu H, Takahashi T, Nomura M, et al. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 2005;**65**(5):1642–6.
129. Buttitta F, Barassi F, Fresu G, et al. Mutational analysis of the HER2 gene in lung tumors from Caucasian patients: mutations are mainly present in adenocarcinomas with bronchioloalveolar features. *Int J Cancer* 2006;**119**(11):2586–91.
130. Schwartz AG, Prysak GM, Bock CH, Cote ML. The molecular epidemiology of lung cancer. *Carcinogenesis* 2007;**28**(3):507–18.
131. Ahrendt SA, Decker PA, Alawi EA. Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 2001;**92**(6):1525–30.
132. Yu ITS, Chiu Y-L, Au JSK, Wong T-W, Tang J-L. Dose-response relationship between cooking fumes exposures and lung cancer among Chinese nonsmoking women. *Cancer Res* 2006;**66**(9):4961–7.
133. 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**(18):5731–4.
134. Mounawar M, Mukeria A, Le Calvez F, et al. Patterns of EGFR, HER2, TP53, and KRAS mutations of p14arf expression in non-small cell lung cancers in relation to smoking history. *Cancer Res* 2007;**67**(12):5667–72.
135. Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, et al. EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Mod Pathol* 2009;**22**(4):508–15.
136. Wong DW-S, Leung EL-H, So KK-T, et al. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer* 2009;**115**(8):1723–33.
137. Takahashi T, Sonobe M, Kobayashi M, et al. Clinicopathologic features of non-small-cell lung cancer with EML4-ALK fusion gene. *Ann Surg Oncol* 2010;**17**(3):889–97.
138. Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008;**14**(13):4275–83.
139. Okudela K, Suzuki M, Kageyama S, et al. PIK3CA mutation and amplification in human lung cancer. *Pathol Int* 2007;**57**(10):664–71.
140. Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2011;**12**(2):175–80.
141. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;**417**(6892):949–54.
142. Paik PK, Arcila ME, Fara M, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol* 2011;**29**(15):2046–51.
143. Sanchez-Cespedes M. The role of LKB1 in lung cancer. *Fam Cancer* 2011;**10**(3):447–53.
144. Wen J, Fu J, Zhang W, Guo M. Genetic and epigenetic changes in lung carcinoma and their clinical implications. *Mod Pathol* 2011;**24**(7):932–43.
145. Sequist LV, Heist RS, Shaw AT, et al. Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Ann Oncol* 2011;**22**(12):2616–24.
146. Ortiz T, Josh V, Heon S, Butaney M, Chen L, Jackman D, et al. The introduction of systematic genomic testing for patients with Non Small Cell Lung cancer at Dana Farber cancer Institute. Chicago, IL; 2011. p. #7517.
147. Lissowska J, Foretova L, Dabek J, et al. Family history and lung cancer risk: international multicentre case-control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses. *Cancer Causes Control* 2010;**21**(7):1091–104.
148. Timofeeva M, Kropp S, Sauter W, et al. Genetic polymorphisms of MPO, GSTT1, GSTM1, GSTP1, EPHX1 and NQO1 as risk

- factors of early-onset lung cancer. *Int J Cancer* 2010;**127**(7): 1547–61.
149. Cote ML, Yoo W, Wenzlaff AS, et al. Tobacco and estrogen metabolic polymorphisms and risk of non-small cell lung cancer in women. *Carcinogenesis* 2009;**30**(4):626–35.
150. Lo YL, Hsiao CF, Jou YS, et al. Polymorphisms of MLH1 and MSH2 genes and the risk of lung cancer among never smokers. *Lung Cancer* 2011;**72**(3):280–6.



Supplementary Fig. 1. Incidence and mortality of cancer in the European Union including LCINS assumed as a separate entity in both sexes (A) and in women only (B) (Cancers are ranked by mortality rates). Adapted from [3] and [24].

E. ARTICLE - Revue de la littérature sur le CBNF à l'occasion des cours du GOLF (Revue des Maladies Respiratoires actualités, 2013)

Couraud S, Wislez M. Cancers broncho-pulmonaires du non-fumeur. *Rev Mal respir Actual*. 2013, 5 :26-33 [Non indexé]

Communication orale associée :

Couraud S. Cancer broncho-pulmonaires chez les non-fumeurs. 18ème congrès de Pneumologie de langue Française (2014). Session Plénière A09.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



Cancers broncho-pulmonaires des non-fumeurs

Lung cancers in never-smoker

S. Couraud^{1,2}, M. Wislez^{3,4,*}

¹Service de pneumologie et oncologie thoracique, Hospices Civils de Lyon, GH Sud, 165 chemin du Grand Revoyet, 69495 Pierre Bénite.

²École doctorale E2M2, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

³Service de Pneumologie, Hôpital Tenon, APHP, 4 rue de la Chine 75970 Paris, France

⁴Equipe de Recherche 2 GRC 04 Theranoscan, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

MOTS CLÉS

Non-fumeur ;
Cancer broncho-
pulmonaire ;
Facteur de risque ;
Biomarqueurs.

Résumé

Un non-fumeur est un individu ayant fumé moins de 100 cigarettes au cours de sa vie. Près d'un quart des cancers broncho-pulmonaires dans le monde surviendraient chez ce type de patient faisant plus de 300 000 morts chaque année.

Pour la plupart des auteurs, il s'agit d'une entité distincte. Ces cancers des non-fumeurs (CBNF) surviennent en effet essentiellement chez des femmes, sont des adénocarcinomes pour la plupart, et concernent essentiellement les asiatiques. Les mutations somatiques qui les caractérisent sont celles de la famille HER (EGFR et HER2) ainsi que les réarrangements d'ALK et ROS1.

Les CBNF sont également un excellent modèle pour l'étude des facteurs de risque de cancer broncho-pulmonaire autres que le tabac et que l'on peut schématiquement scinder en cinq familles : les toxiques inhalés, les polluants professionnels, les polluants domestiques, les polluants atmosphériques et les antécédents personnels et familiaux.

Malgré sa fréquence et son intérêt, le CBNF reste une entité très mal connue, particulièrement en Europe où il est probable que son épidémiologie soit singulièrement différente de ce qui est observé en Asie ou même en Amérique du Nord.

© 2013 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

KEYWORDS

Never smoker;
Lung cancer;
Risk-factor;
Biomarker

Summary

A never-smoker is defined as a subject who smoked less than 100 cigarettes in his/her lifetime. About one quarter of all lung cancers occurring worldwide is thought to happen in such patients and 300,000 deaths are related to lung cancer in never-smoker (LCINS) each year.

For most of authors, LCINS is a distinct entity. Actually, they occur mainly in women, are mostly adenocarcinoma, and arise particularly in Asia. Moreover, tumors have a specific

*Auteur correspondant.

Adresse e-mail : marie.wislez@tnn.aphp.fr (M. Wislez).

mutation profile among never-smoker: HER family (EGFR and HER2) mutations are common as well as ALK and ROS1 fusion gene.

LCINS are also a perfect model for the study of non-tobacco related risk factors of lung cancer. These factors could be clustered in five families: inhaled toxic, professional pollutants, domestic pollutants, atmospheric pollutants and personal and familial medical history.

Although LCINS is not rare and of high-interest, there are very few data on this entity, in particular in Europe. Indeed, epidemiology of LCINS is strongly affected by geographical origin of patients and features observed in Europe should be different from those observed in Asia or North America.

© 2013 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Un non-fumeur est défini de manière consensuelle et stricte : il s'agit d'un individu ayant fumé moins de 100 cigarettes au cours de sa vie [1]. Bien entendu, les non-fumeurs doivent également être vierges de toute consommation de tabac alternative (pipe, cigares, chique) - y compris traditionnelle (*chicha*, *bidi*...).

Le terme français de non-fumeur est malheureusement trompeur puisque l'on a intuitivement tendance à y inclure les ex-fumeurs (Tableau 1). Cette erreur - bien que fréquente - est pourtant très dommageable car elle est à l'origine d'un important biais de classement. En effet, les ex-fumeurs conservent un risque de développer un cancer broncho-pulmonaire déterminé par leur consommation antérieure. Bien entendu ce risque diminue de manière importante avec le temps et ne doit pas faire oublier le bénéfice majeur du sevrage tabagique (à tout âge) ; mais il n'en reste pas moins qu'un ex-fumeur conserve un risque plus élevé qu'un individu n'ayant jamais fumé et que ces deux catégories ne doivent donc pas être confondues [2,3]. Si chez un ex-fumeur, il est hautement probable que la survenue d'un cancer broncho-pulmonaire soit directement liée à sa consommation antérieure de cigarettes, ce n'est en effet pas le cas chez un non-fumeur strict [4,5]. Dans cette revue, le lecteur devra donc désormais comprendre le terme « non-fumeur » comme se référant à un « jamais-fumeur ».

La définition précise du statut tabagique repose donc sur deux pivots : la connaissance des définitions par l'examineur d'une part ; et l'interrogatoire précis du patient d'autre part. Il faudra notamment être particulièrement vigilant avec les expositions très anciennes (« pendant mon service militaire »), très faibles (« uniquement en soirée ») ou plus surprenantes (« oui mais je n'inhalais pas la fumée »)

qui peuvent malgré tout facilement atteindre le seuil des 100 cigarettes et faire basculer le patient de « non- » à « ex- ».

Pour la plupart des auteurs, les cancers broncho-pulmonaires survenant chez des non-fumeurs (CBNF) sont en effet des entités à part [1,6]. En effet, leurs mécanismes oncogéniques ne reposent pas sur l'exposition directe aux carcinogènes du tabac. D'autres agents cancérigènes - s'associant à des mécanismes de susceptibilité individuelle - sont responsables de la tumorigénèse. Le CBNF devient alors une maladie multifactorielle révélant d'autres voies oncogéniques et d'autres facteurs de risque de développer un cancer bronchique qui sont autant de témoins de son originalité et de son intérêt.

Épidémiologie des CBNF

L'épidémiologie des CBNF est rendue complexe compte-tenu du très petit nombre de données fiables disponibles sur ce sujet. En effet, malheureusement, les données populationnelles - comme les registres ou les bases de données sur la mortalité - n'intègrent que très rarement des informations précises sur le statut tabagique au cours de la vie. Par conséquent, les données épidémiologiques du CBNF proviennent le plus souvent d'études de sous-groupe rétrospectives avec le spectre du biais de classement évoqué ci-dessus [7].

Le CBNF est-il une entité fréquente ?

Si l'on en croit les données du Centre International de Recherche sur le Cancer, sur les 1,35 millions de nouveaux cancers broncho-pulmonaires diagnostiqués en 2002 dans le monde, près de

Tableau 1 Définition des statuts tabagiques.

Terminologie française	Terminologie anglaise	> 100 cigarettes dans la vie ?	A stoppé sa consommation ?*
Non-fumeur	<i>Never-smoker</i>	NON	-
Ex-fumeur	<i>Former smoker</i>	OUI	OUI
Fumeur actif	<i>Current smoker</i>	OUI	NON

*Le délai de sevrage permettant d'entrer dans la catégorie « ex-fumeur » ne fait malheureusement pas l'objet d'une définition consensuelle. Ce délai varie de 1 mois à 2 ans selon les auteurs. Il paraît toutefois assez pertinent de retenir la valeur de 1an, constituant d'ailleurs le délai le plus communément accepté dans les essais cliniques s'adressant aux anciens-fumeurs [45].

25 % des cancers broncho-pulmonaires seraient survenus chez des non-fumeurs [6,8]. Au total, environ 300 000 personnes décèderaient chaque année d'un CBNF dans le monde [6]. De même, aux États-Unis, 10 à 15 % des cancers broncho-pulmonaires ne seraient pas liés au tabagisme actif [7]. Ces estimations ne doivent toutefois pas être transposées *in extenso* à une population française (voire même européenne). Il existe en effet une très grande labilité géographique des CBNF. Ces derniers semblent en effet plus de quatre fois plus fréquent en Asie et deux fois plus fréquent aux États-Unis d'Amérique qu'en Europe [6]. Considérés à part, les CBNF seraient ainsi la 7^e cause de mortalité par cancer dans le monde (devant les cancers du col utérin, du pancréas et de la prostate) et dans les 10 premières causes aux États-Unis d'Amérique [9]. Globalement, l'incidence du CBNF est comprise entre 4,8 et 20,8 nouveaux cas par an et pour 100 000 personnes ce qui est globalement similaire à celle du myélome ou du cancer du col de l'utérus [4]. En France, les données sont rares. Le registre des cancers du Bas-Rhin retrouvait une prévalence des CBNF de 1,4 % chez les hommes et 28,9 % chez les femmes pour les cas diagnostiqués entre 1982 et 1997 [10]. En 2000, l'enquête KBP du collège des hôpitaux généraux français retrouvait une prévalence de CBNF à 2,5 % chez les hommes et 32,3 % chez les femmes [11]. Au total, il semble bien que le CBNF soit une entité fréquente et grave.

Est-ce une maladie en augmentation ?

C'est probablement la seconde question qui vient à l'esprit lorsque l'on traite de ce sujet puisque empiriquement, les cliniciens semblent le ressentir. Les données objectives sont toutefois contradictoires. À la fin des années 1990, Bofetta et collègues ont noté que l'incidence des CBNF avait été multipliée par 3,6 dans une cohorte suédoise d'hommes non-fumeurs et entre 1976-80 et 1991-95 [12]. Ces observations ont ensuite été confirmées dans une étude groupée de plusieurs cohortes prospectives [13]. Toutefois, dans la population féminine américaine, il semble que ni l'incidence ni le taux de mortalité, n'ait progressé depuis les années 1930. Par contre, il semble acquis que - contrairement à une idée reçue - l'incidence des CBNF est similaire chez les hommes et les femmes en Europe et aux États-Unis d'Amérique alors que son analyse est plus complexe en Asie, semblant progresser chez les femmes [14]. En France, les résultats comparés des études KBP montrent que la proportion de non-fumeurs parmi les nouveaux cas de cancers broncho-pulmonaires a progressé de 7,1 % à 10,9 % en 10 ans [11,15]. Tous les auteurs s'accordent néanmoins à écrire que la plupart des études considérées sont très hétérogènes et donc difficiles à interpréter ensembles. Seules des études dédiées, ajustées sur les nombreux facteurs confondants possibles (aux premiers rangs desquels l'âge, le sexe et l'origine ethnique), pourraient apporter la réponse à la question posée. Ainsi, au total, il semble difficile de répondre de manière tranchée à la question posée et sage de conclure qu'il s'agit d'une maladie en augmentation en Asie chez les femmes et au mieux stable en Europe.

En quoi est-ce une maladie différente ?

Contrairement au paragraphe précédent, les faits sont ici bien établis et globalement consensuels. Le profil des patients atteint de CBNF est en effet très significativement différent comparés

aux cancers broncho-pulmonaires des fumeurs. Ce sont des femmes pour la très grande majorité d'entre eux [1,6]. Comme évoqué plus haut, il existe une très grande labilité ethnique puisque le CBNF est plus fréquent chez les asiatiques que chez les américaines puis les européennes. De même, le taux de mortalité est plus important chez les personnes d'origine asiatique vivant en Asie et chez les afro-américains comparés aux personnes d'origine caucasienne. Par contre, et également contrairement à une idée reçue, les hommes atteints de CBNF conservent un taux de décès plus important que les femmes [14].

L'âge de survenue reste sujet à controverse. En France, il semble que le CBNF survient plus volontiers chez les sujets âgés. L'enquête « sujets âgés » menée par l'Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique (IFCT) retrouvait 11,1 % de non-fumeurs chez les patients de plus de 70 ans atteints de cancer broncho-pulmonaire. De manière intéressante, cette fréquence semblait augmenter avec l'âge : 7,2 % de 70 à 74 ans et 17,2 % après 80 ans [16]. De même, la proportion de non-fumeurs après 70 ans est 11,2 % dans l'enquête KBP2000 contre 5,3 % avant 70 ans [11]. À l'inverse, des données asiatiques suggèrent que les CBNF pourraient survenir à un âge plus précoce [5,17]. L'hypothèse d'une distribution bimodale des cas en fonction de l'âge de survenue n'a pas été testée spécifiquement à ce jour.

Le pronostic des CBNF paraît meilleur que celui des cancers survenant chez les fumeurs. Il faut toutefois y voir probablement d'une part le poids des comorbidités associés au tabagisme actif venant grever la morbi-mortalité des fumeurs et d'autre part, une instabilité génétique moins importante que celle observée chez les cancers du fumeur. Ceci est associé à une détection plus fréquente d'anomalies moléculaires somatiques « *drivers* » conférant une efficacité des thérapies ciblées. Enfin, il ne faut pas oublier que l'arrêt du tabac (et donc *a fortiori*, l'absence de tabagisme) reste définitivement associée à un meilleur pronostic du cancer bronchique, particulièrement pour les stades précoces chirurgicaux. Au total, il n'existe à ce jour pas d'argument solide pour étayer l'hypothèse d'un meilleur pronostic constitutionnel des CBNF par rapport à ceux survenant chez les fumeurs [6].

Sur le plan anatomopathologique, les adénocarcinomes sont le type histologique de loin le plus fréquent chez les non-fumeurs [1]. Les cancers à petites cellules sont quasi-inexistants dans cette population et il semble d'ailleurs prudent de remettre en cause le diagnostic dans ce cas [18]. Le profil moléculaire des CBNF fait l'objet de nombreuses publications. Il présente en effet un profil tout à fait original semblant toutefois modulé par l'origine ethnique des patients [1]. Il est désormais bien connu que les mutations de l'*EGFR* y sont beaucoup plus fréquentes. À l'inverse, les mutations de *KRAS* sont plus fréquentes chez les fumeurs et - lorsqu'elles existent chez les non-fumeurs - présentent un profil particulier. Il s'agit en effet plus volontiers de transversion¹ GT tandis que les non-fumeurs présentent des transitions²

1 Une transversion consiste en un remplacement d'une base pyrimidique (A ou G) par une base purique (G ou C) ou vice-versa.

2 Une transition consiste en un remplacement d'une base par une base homologue (pyrimidique remplacée par pyrimidique et purique remplacée par purique).

GA. On retrouve le même genre de constatation avec les mutations de *P53* (les fumeurs présentent des transversions GC et des transitions GA alors que les non-fumeurs portent des transversions GT) [19,20]. Les mutations *BRAF* semblent plus fréquentes chez les fumeurs [21] tout comme les mutations de *NRAS* [22]. Ces deux derniers biomarqueurs font d'ailleurs partie de la cascade signalétique de *KRAS*. De même, les mutations de *HER2*

- appartenant à la même famille que l'*EGFR* - semblent plus communes chez les non-fumeurs (Tableau 2) [23]. Les réarrangements du gène *ALK* sont la seconde cause par ordre de fréquence - après les mutations de l'*EGFR* - d'anomalies moléculaires des CBNF chez les caucasiens mais paraissent moins commune chez les non-fumeurs asiatiques [1,24,25]. Le réarrangement *ROS1* récemment décrit et rapportés comme conférant une sensibilité au crizotinib paraît plus fréquent chez les non-fumeurs [26]. Pour terminer, les mutations de *PI3KCA* - fréquemment associés à d'autres mutations somatiques comme *KRAS* ou *EGFR* alors que les autres paraissent mutuellement exclusives dans la grande majorité des cas - semblent peu affectées par le statut tabagique [27]. Au total, plus de 80 % des CBNF en Asie et 55 % aux États-Unis d'Amérique, présentent une anomalie moléculaire. Étonnamment, il semble exister une dichotomie bien nette entre les profils mutationnels des fumeurs (*KRAS*, *BRAF*, *NRAS*) et des non-fumeurs (*EGFR* et *HER2* et *ALK* et *ROS1*) supportant l'idée de voies oncogéniques différentes probablement activées par différents cancérogènes [1].

Les disparités dans l'épidémiologie du CBNF suggèrent qu'il s'agit bien d'une entité à part mais aussi - et surtout - que cette population n'apparaît pas si homogène que supposé. Il est fort probable en effet que les différences observées - par exemple selon le sexe ou l'origine ethnique - soient en réalité le reflet d'une exposition à des facteurs de risque hétérogènes du cancer broncho-pulmonaire ainsi que des susceptibilités génétiques intrinsèquement différentes.

Tableau 2 Comparaison schématique des fréquences de mutation de certains bio-marqueurs en fonction du statut tabagique du patient.

Biomarqueur	Non-fumeur	Fumeur
EGFR	↑↑	↓
HER2	↑	
KRAS		↑↑
BRAF		↑
NRAS		↑
ALK	↑	
ROS1	↑	
PI3KCA	=	=

Tableau 3 Indicateurs habituellement utilisés et facilement calculables en routine pour évaluer l'exposition à certains facteurs de risque de cancer broncho-pulmonaire (ATCD : Antécédent)

Facteur de risque	Définition	Indicateur	Calcul de l'indicateur
Cannabis	Consommation de plus de 20 joints dans la vie	Joint-année (JA)	1 JA = Consommation de un joint par jour pendant un an
Tabagisme passif	Expositions continue durant plus de 1 an à un fumeur-actif vivant sous le même toit (domestique) ou travaillant dans la même pièce (travail). Il est d'usage de distinguer les expositions dans l'enfance et à l'âge adulte.	Fumeur-année (FA)	1 FA = exposition à un fumeur pendant une année.
Huile de cuisson	Utilisation répétée (au moins hebdomadaire) de méthode de cuisson des aliments par friture ou cuisine sautée.	Plat-année (PA)	1 PA = préparation de un plat par jour pendant 1 an.
Fumées de combustibles solides	Exposition continue durant plus de 1 an à un chauffage ou une cuisinière fonctionnant au moyen d'un des combustibles suivant : bois, charbon, déchets ménager et granulés de bois.	Pourcentage de vie exposé.	
ATCD Familial	Un parent ou descendant (biologique) au 1 ^{er} degré (père, mère, enfant) atteint de cancer broncho-pulmonaire	OUI / NON Nombre de personnes	

Les facteurs de risque de cancer bronchique chez des non-fumeurs

L'absence d'exposition directe au tabagisme implique logiquement l'exposition à d'autres facteurs de risque. Ceux-ci ne sont toutefois pas spécifiques des non-fumeurs (*i.e.* ils sont également des facteurs de risque chez le fumeur) bien qu'ils soient beaucoup plus caractéristiques et faciles à mettre en évidence dans cette population. Ces facteurs de risque peuvent également être cumulés chez un même individu, voire être synergiques (l'effet est multiplicatif et non additif). Leur effet individuel est alors plus difficile à mettre en évidence. Malheureusement, il n'existe pas de seuil au-delà duquel le risque apparaît. Habituellement, deux paramètres sont étudiés pour évaluer l'effet d'un facteur : sa dose et sa durée d'exposition. Logiquement, lorsque ces deux paramètres augmentent, le risque doit également augmenter. Cela implique toutefois de disposer d'indicateurs de mesure fiables et consensuels pour chacun des facteurs étudiés [1]. Le tableau 3 donne la liste de certains indicateurs utilisés

de manière consensuelle pour chiffrer l'exposition à certains facteurs de risque abordés dans cette revue.

On peut regrouper de manière didactique les facteurs de risques de cancer broncho-pulmonaire en cinq grandes familles : les toxiques inhalés, les polluants professionnels, les polluants domestiques, les polluants atmosphériques et les antécédents et style de vie du patient.

Le premier groupe - l'exposition aux toxiques inhalés - comprend (outre le tabagisme actif) l'exposition au cannabis et le tabagisme passif (Fig. 1). L'exposition au tabagisme passif est particulièrement bien documentée. On considère en effet que vivre ou travailler avec un fumeur augmente globalement le risque de survenue d'un cancer bronchique de 24 %. Bien entendu, ce risque augmente avec la durée d'exposition et la quantité de cigarette fumée par le (ou les) fumeur-index [28]. Ce problème n'est pas anecdotique si l'on considère que - selon un travail de l'OMS rapporté en 2011 - en 2004 40 % des enfants et un tiers des adultes dans le monde étaient exposés au tabagisme passif et que plus de 600 000 décès par an y étaient directement attribués [29].

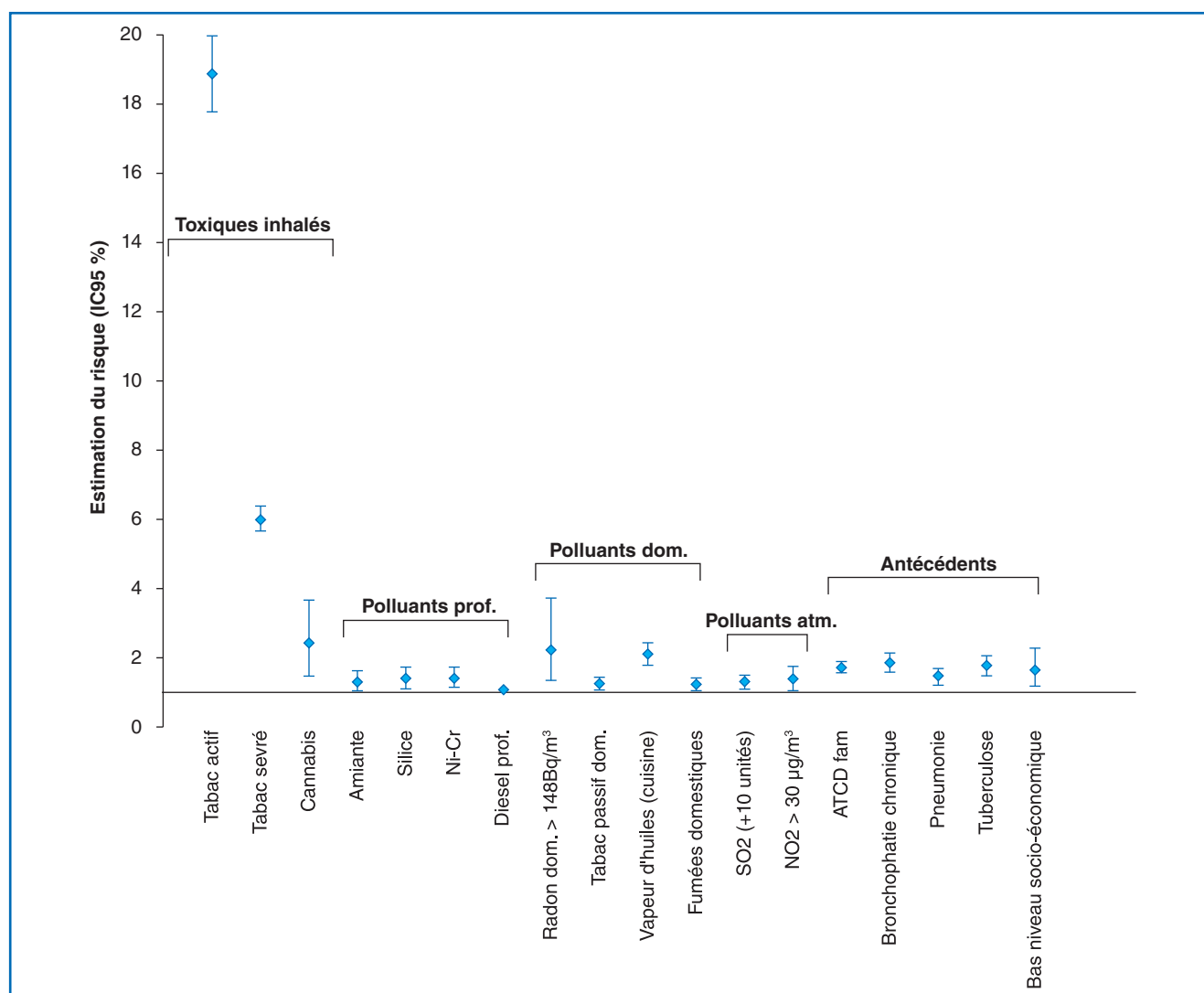


Figure 1. Représentation schématique des rapports de risque de différents facteurs de risque de cancer broncho-pulmonaire. Figure adaptée de [1,2,28,31,34,37,39,40,47-51]. Le risque amiante ne comprend pas le risque pour les mésothéliomes. Ni - Nickel ; Cr - Chrome ; prof - Professionnel ; dom - Domestique ; atm - Atmosphérique ; fam - Familiaux.

L'exposition aux polluants professionnels (dont fait d'ailleurs également partie le tabagisme passif) est plus complexe à évaluer [30]. Dans ce domaine, l'utilité du Centre International de Recherche sur le Cancer est assez fondamentale. Cette agence de l'Organisation Mondiale de la Santé étudie puis classe les agents en fonction de leur risque cancérigène chez l'homme³. C'est ainsi que récemment, le centre a classifié l'exposition au Diesel comme étant un cancérigène certain pour l'homme sur la base d'une étude épidémiologique menée chez des professionnels exposés [31]. Ce composé est venu grossir la liste des autres cancérigènes professionnels connus parmi lesquels l'amiante, la silice, le nickel et chrome ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques [1]. En France, l'exposition aux cancérigènes professionnels pourrait être responsable de 20 % des cancers broncho-pulmonaires. Leur mise en évidence revêt une importance toute particulière puisqu'elle implique alors une déclaration pour permettre une réparation et la prise en charge sociale du sujet exposé. Il existe malheureusement une sous déclaration (et probablement une sous-détection) importante [32].

Le troisième groupe - l'exposition aux polluants domestiques - est moins connu. Il contient notamment l'exposition aux vapeurs d'huile de cuisson utilisées pour la cuisine frite ou sautée (méthodes de cuisson traditionnelles asiatiques et donc particulièrement étudiées et incriminées en Asie) [33] ainsi que l'exposition aux fumées de combustions des combustibles solides utilisés pour le chauffage ou la cuisine (charbon, bois, autres) [34]. Enfin, on a l'habitude de classer l'exposition au Radon environnemental dans cette catégorie. Ce gaz radioactif naturel, est produit par les roches granitiques et volcaniques. Il serait à l'origine de près de 2 500 à 3 500 morts par cancer broncho-pulmonaire en France et fait l'objet d'une information et d'une surveillance particulière depuis quelques années⁴. On notera pour mémoire que ce risque est particulièrement synergique en cas de tabagisme actif (risque 25 fois plus important chez un fumeur par rapport à un non-fumeur à exposition égale) [35]. En France, on estime que 5 à 7 % des CBNF sont liés à la pollution atmosphérique et les non-fumeurs y semblent particulièrement sensibles [36]. Ce risque existe tant pour la pollution gazeuse (oxyde de soufre et d'azote notamment) que pour la pollution particulaire (contenant entre autre les particules émises lors de la combustion du diesel) [37,38].

Enfin, la cinquième catégorie regroupe les antécédents familiaux (1^{er} degré) de cancer broncho-pulmonaire (particulièrement si deux ou plus sont atteints ; mais le risque semble moins intense chez les non-fumeurs) [39], les antécédents personnels de bronchopathie chronique, de pneumonie ou de tuberculose [40] et un bas niveau socio-économique [41]. Enfin, chez les femmes, l'exposition aux traitements hormonaux (contraception et/ou traitement substitutif de la ménopause) ainsi que la vie génitale semble également contribuer à moduler le risque individuel de cancer broncho-pulmonaire et pourrait expliquer en partie la différence de

Tableau 4 Estimation des proportions de risque attribuable de cancer broncho-pulmonaire en Europe.

Facteur de risque	Estimation de la proportion de risque attribuable	Référence
Cancérogènes professionnels	20 %*	[32]
Tabagisme passif (homme / femme)	10,3 % et 14,2 %	[44]
Radon	2,2-12,4 %*	[46]
Pollution atmosphérique	5-7 %	[36]
Antécédent de tuberculose	2,4 %	[44]
Antécédent familial	1,2 %	[44]

* Non-fumeurs et fumeurs associés.

genre observée dans les CBNF [1,4]. Une méta-analyse de deux essais randomisés (testant des molécules d'origines équine non utilisés en France) a d'ailleurs retrouvé un risque relatif de 1,4 (IC 95 %, 1,03-1,8) en cas d'utilisation d'un traitement substitutif de la ménopause associant œstrogène et progestérone [42].

Assez peu de travaux nous renseignent toutefois sur la part relative de chacun de ces facteurs de risque au sein d'une population. Dans une étude sur 62 non-fumeurs français, l'équipe du CHU de Nancy a montré que - en France - l'exposition au tabagisme passif était le facteur de risque le plus fréquent chez les femmes tandis que l'exposition aux carcinogènes professionnels était le plus commun chez les hommes [43]. Toutefois, plus d'un-tiers des cas n'étaient expliqués ni par l'un, ni par l'autre de ces deux facteurs. Plus récemment, une étude s'est intéressée au calcul des proportions de risque attribuable en Chine, en Europe et aux États-Unis d'Amérique (malheureusement sans évaluer l'exposition aux cancérigènes professionnels). Il ressort que le tabagisme passif domestique ou professionnel reste le facteur de risque le plus fréquemment incriminé (plus fréquemment en Chine puis en Europe et enfin aux États-Unis) suivis par les antécédents de tuberculose et l'exposition au radon domestique. Les antécédents de pneumonie et de BPCO semblent assez peu compter (moins de 1 %). Pour terminer, l'exposition domestique aux fumées de combustion du charbon serait responsable de près de 20 % des CBNF en Chine [44] (Tableau 4). Cette étude montre surtout l'importante variation de la proportion de risque attribuable en fonction des zones géographiques d'étude et du sexe.

Conclusion

Il apparaît de toutes ces données que le CBNF est une entité distincte, fréquente et grave mais paradoxalement très mal connue et décrite principalement au travers d'études de

3 <http://monographs.iarc.fr/>

4 <http://www.e-cancer.fr/prevention/environnement-et-cancers/radon/>

sous-groupes rétrospectives ou de séries asiatiques. Alors que cette entité est très sensible à l'origine ethnique, le CBNF est encore plus mal connu en Europe. L'étude BioCAST / IFCT-1002 (NCT01465854) est une cohorte prospective des cas de CBNF diagnostiqués en France au cours de l'année 2012. Elle vise à décrire l'exposition aux facteurs de risque, le profil clinique, moléculaire tumoral et génomique constitutionnel d'une population de non-fumeurs résidant en France et atteints de cancer broncho-pulmonaire. Ses résultats devraient être disponibles en 2013-2014. L'étude GEM, promue par l'EORTC (NCT01838577) s'intéressera également en détail aux non-fumeurs porteurs d'une mutation de l'EGFR. Les inclusions devraient débuter en 2014. Ces études devraient permettre de mieux appréhender le CBNF et donner des réponses aux questions légitimes posées par les patients et leur entourage.

Liens d'intérêts

S. Couraud déclare être consultant pour Roche, Chugai et Astra Zeneca ; avoir reçu des financements pour travaux de recherche (versés à son institution) d'AstraZeneca, Roche, Pierre-Fabre, Boehringer-Ingelheim, Pfizer, Lilly ; avoir bénéficié de financements pour assister à une conférence de Roche et AstraZeneca.

M. Wislez déclare être consultant pour Lilly, Boehringer-Ingelheim ; avoir reçu des financements pour travaux de recherche de Boehringer-Ingelheim ; avoir reçu des financements pour de la formation continue de Lilly, AstraZeneca, Roche et Boehringer-Ingelheim.

Références

- [1] Couraud S, Zalcman G, Milleron B, Morin F, Souquet P-J. Lung cancer in never smokers--a review. *Eur J Cancer* 2012;48:1299-311.
- [2] Thun MJ, Carter BD, Feskanich D, Freedman ND, Prentice R, Lopez AD, et al. 50-year trends in smoking-related mortality in the United States. *N Engl J Med* 2013;368:351-64.
- [3] Peto R, Darby S, Deo H, Silcocks P, Whitley E, Doll R. Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *BMJ* 2000;321:323-9.
- [4] Alberg AJ. Epidemiology of Lung Cancer Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2013;143(5suppl):e1S.
- [5] Toh C-K, Gao F, Lim W-T, Leong S-S, Fong K-W, Yap S-P, et al. Never-smokers with lung cancer: epidemiologic evidence of a distinct disease entity. *J Clin Oncol* 2006;24:2245-51.
- [6] Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat Rev Cancer* 2007;7:778-90.
- [7] Samet JM, Avila-Tang E, Boffetta P, Hannan LM, Olivo-Marston S, Thun MJ, et al. Lung cancer in never smokers: clinical epidemiology and environmental risk factors. *Clin Cancer Res* 2009;15:5626-45.
- [8] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.
- [9] Blair A, Freeman LB. Lung cancer among nonsmokers. *Epidemiol Camb Mass* 2006;17:601-3.
- [10] Foeglé J, Hédelin G, Lebitasy M-P, Purohit A, Velten M, Quoix E. Specific features of non-small cell lung cancer in women: a retrospective study of 1738 cases diagnosed in Bas-Rhin between 1982 and 1997. *J Thorac Oncol* 2007;2:466-74.
- [11] Blanchon F, Grivau M, Collon T, Zureik M, Barbieux H, Bénichou-Flurin M, et al. Epidemiologic of primary bronchial carcinoma management in the general French hospital centers. *Rev Mal Respir* 2002;19:727-34.
- [12] Boffetta P, Järnholm B, Brennan P, Nyrén O. Incidence of lung cancer in a large cohort of non-smoking men from Sweden. *Int J Cancer* 2001;94:591-3.
- [13] Wakelee HA, Chang ET, Gomez SL, Keegan TH, Feskanich D, Clarke CA, et al. Lung cancer incidence in never smokers. *J Clin Oncol* 2007;25:472-8.
- [14] Thun MJ, Hannan LM, Adams-Campbell LL, Boffetta P, Buring JE, Feskanich D, et al. Lung cancer occurrence in never-smokers: an analysis of 13 cohorts and 22 cancer registry studies. *Plos Med* 2008;5:e185.
- [15] Locher C, Debieuvre D, Coëtmeur D, Goupil F, Molinier O, Collon T, et al. Major changes in lung cancer over the last ten years in France: The KBP-CPHG studies. *Lung Cancer* 2013;81:32-8.
- [16] Quoix E. Novel epidemiology in lung cancer - non-smokers, women and cannabis. *Rev Mal Respir* 2007;24(8Pt2):6S10-15.
- [17] Kawaguchi T, Takada M, Kubo A, Matsumura A, Fukai S, Tamura A, et al. Gender, histology, and time of diagnosis are important factors for prognosis: analysis of 1499 never-smokers with advanced non-small cell lung cancer in Japan. *J Thorac Oncol* 2010;5:1011-7.
- [18] Kurahara Y, Kawaguchi T, Tachibana K, Atagi S, Hayashi S, Kitaichi M, et al. Small-cell lung cancer in never-smokers: a case series with information on family history of cancer and environmental tobacco smoke. *Clin Lung Cancer* 2012;13:75-9.
- [19] Mounawar M, Mukeria A, Le Calvez F, Hung RJ, Renard H, Cortot A, et al. Patterns of EGFR, HER2, TP53, and KRAS mutations of p14arf expression in non-small cell lung cancers in relation to smoking history. *Cancer Res* 2007;67:5667-72.
- [20] Rudin CM, Avila-Tang E, Harris CC, Herman JG, Hirsch FR, Pao W, et al. Lung cancer in never smokers: molecular profiles and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2009;15:5646-61.
- [21] Paik PK, Arcila ME, Fara M, Sima CS, Miller VA, Kris MG, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol* 2011;29:2046-51.
- [22] Ohashi K, Sequist LV, Arcila ME, Lovly CM, Chen X, Rudin CM, et al. Characteristics of Lung Cancers Harboring NRAS Mutations. *Clin. Cancer Res* 2013;19:2584-91.
- [23] Mazieres J, Peters S, Lepage B, Cortot AB, Barlesi F, Beau-Faller M, et al. Lung cancer that harbors a her2 mutation: epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives. *J Clin Oncol* 2013;31:1997-2003.
- [24] Li C, Fang R, Sun Y, Han X, Li F, Gao B, et al. Spectrum of oncogenic driver mutations in lung adenocarcinomas from East Asian never smokers. *Plos One* 2011;6:e28204.
- [25] Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2011;12:175-80.
- [26] Yoshida A, Kohno T, Tsuta K, Wakai S, Arai Y, Shimada Y, et al. ROS1-Rearranged Lung Cancer. *Am J Surg Pathol* 2013;37:554-62.
- [27] Kawano O, Sasaki H, Endo K, Suzuki E, Haneda H, Yukiue H, et al. PIK3CA mutation status in Japanese lung cancer patients. *Lung Cancer Amst Neth* 2006;54:209-15.
- [28] Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ* 1997;315:980-8.
- [29] Oberg M, Jaakkola MS, Woodward A, Peruga A, Prüss-Ustün A. Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. *Lancet* 2011;377:139-46.
- [30] Couraud S, Fournel P, Moro-Sibilot D, Pérol M, Souquet P-J. Professional practice and accessibility to equipment in thoracic

- oncology. Results of a survey in Rhône-Alpes region (France). *Bull. Cancer (Paris)* 2011;98:613-23.
- [31] Olsson AC, Gustavsson P, Kromhout H, Peters S, Vermeulen R, Brüske I, et al. Exposure to diesel motor exhaust and lung cancer risk in a pooled analysis from case-control studies in Europe and Canada. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:941-8.
- [32] Pairon J-C, Andujar P, Matrat M, Ameille J. Etiology, epidemiology, biology. Occupational respiratory cancers. *Rev Mal Respir* 2008;25(8Pt2):3S18-31.
- [33] Yu ITS, Chiu Y-L, Au JSK, Wong T-W, Tang J-L. Dose-response relationship between cooking fumes exposures and lung cancer among Chinese nonsmoking women. *Cancer Res* 2006;66:4961-7.
- [34] Lissowska J, Bardin-Mikolajczak A, Fletcher T, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, et al. Lung cancer and indoor pollution from heating and cooking with solid fuels: the IARC international multicentre case-control study in Eastern/Central Europe and the United Kingdom. *Am J Epidemiol* 2005;162:326-33.
- [35] Darby S, Hill D, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochicchio F, 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.
- [36] Trédaniel J, Aarab-Terrisse S, Teixeira L, Savinelli F, Fraboulet S, Gossot D, et al. Atmospheric air pollution and lung cancer: epidemiologic data. *Rev Mal Respir* 2009;26:437-45.
- [37] Katanoda K, Sobue T, Satoh H, Tajima K, Suzuki T, Nakatsuka H, et al. An association between long-term exposure to ambient air pollution and mortality from lung cancer and respiratory diseases in Japan. *J Epidemiol* 2011;21:132-43.
- [38] Pope CA 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002;287:1132-41.
- [39] Lissowska J, Foretova L, Dabek J, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, et al. Family history and lung cancer risk: international multicentre case-control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses. *Cancer Causes Control* 2010;21:1091-104.
- [40] Brenner DR, McLaughlin JR, Hung RJ. Previous lung diseases and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Plos One* 2011;6:e17479.
- [41] Sidorchuk A, Agardh EE, Aremu O, Hallqvist J, Allebeck P, Moradi T. Socioeconomic differences in lung cancer incidence: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes Control* 2009;20:459-71.
- [42] Greiser CM, Greiser EM, Dören M. Menopausal hormone therapy and risk of lung cancer-Systematic review and meta-analysis. *Maturitas* 2010;65:198-204.
- [43] Clément-Duchêne C, Vignaud J-M, Stoufflet A, Bertrand O, Gislard A, Thiberville L, et al. Characteristics of never smoker lung cancer including environmental and occupational risk factors. *Lung Cancer Amst Neth* 2010;67:144-50.
- [44] Sisti J, Boffetta P. What proportion of lung cancer in never-smokers can be attributed to known risk factors? *Int J Cancer J Int Cancer* 2012;131:265-75.
- [45] Keith RL, Miller YE. Lung cancer chemoprevention: current status and future prospects. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10:334-43.
- [46] Cancer et environnement. Expertise collective. [Internet]. AFS-SET, INSERM; 2008 p. 95. Available from: https://www.google.ca/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CDUQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.inserm.fr%2Fcontent%2Fdownload%2F946%2F9496%2Ffile%2Fec_cancers_environnement_der.pdf&ei=TOekUeWnJ4PRyQH12IGIBA&usq=AFQjCNHM7c528huU_kl58YENNxluv5BTkg&sig2=6uyqemBkvdZ7ksaZBtFuDQ&bvm=bv.47008514,d.aWM.
- [47] Berthiller J, Straif K, Boniol M, Voirin N, Benhaïm-Luzon V, Ayoub WB, et al. Cannabis smoking and risk of lung cancer in men: a pooled analysis of three studies in Maghreb. *J Thorac Oncol* 2008;3:1398-403.
- [48] De Matteis S, Consonni D, Lubin JH, Tucker M, Peters S, Vermeulen RC, et al. Impact of occupational carcinogens on lung cancer risk in a general population. *Int J Epidemiol* 2012;41:711-21.
- [49] Barros-Dios JM, Ruano-Ravina A, Pérez-Ríos M, Castro-Bernárdez M, Abal-Arca J, Tojo-Castro M. Residential radon exposure, histologic types, and lung cancer risk. A case-control study in Galicia, Spain. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012;21:951-8.
- [50] Zhao Y, Wang S, Aunan K, Seip HM, Hao J. Air pollution and lung cancer risks in China--a meta-analysis. *Sci Total Environ* 2006;366:500-13.
- [51] Booth CM, Li G, Zhang-Salomons J, Mackillop WJ. The impact of socioeconomic status on stage of cancer at diagnosis and survival: a population-based study in Ontario, Canada. *Cancer* 2010;116:4160-7.

VII. L'ÉTUDE BIOCAST / IFCT1002

A. Type d'étude

Le Bio-Observatoire National du Cancer Broncho-pulmonaire du Patient Non-fumeur (IFCT-1002 BioCAST) est une étude épidémiologique de cohorte, non-interventionnelle, prospective, multicentrique, comportant un volet clinique et un volet biologique.

B. Objectifs de l'étude

1. Objectif principal

L'objectif principal de cette étude est de décrire les caractéristiques cliniques et moléculaires, et l'exposition aux facteurs de risque d'une cohorte Française de patients non-fumeurs atteints d'un cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules.

2. Objectifs secondaires

Les objectifs secondaires sont :

- Décrire l'impact de l'exposition à certains facteurs de risque ou en fonction de critères histo-clinique sur le profil moléculaire somatique;
- Constituer une collection biologique d'échantillons sanguins et tumoraux issus de patients non-fumeurs atteints d'un CBNPC, en vue d'analyses ultérieures.

C. Responsabilités

1. Promoteur

Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique (IFCT)

Directeur : Monsieur Franck Morin

Président : Pr Gérard Zalcman

10 rue de la Grange-Batelière, 75009 PARIS

Tel 01.56.81.10.45

2. Investigateur coordonnateur

Dr Sébastien Couraud

Service de Pneumologie Aiguë Spécialisée et Cancérologie Thoracique

Hospices Civils de Lyon, CH Lyon Sud

165 chemin du Grand Revoyet, 69495 Pierre Bénite Cedex

Tel 04 78 86 44 05 – Fax 04 78 86 44 19

3. Comité directeur

Dr ARIGON Jean-Philippe (Clamart) - Pr ASTOUL Philippe (Marseille) - Dr BEAU-FALLER Michèle (Strasbourg) - Dr BELLIERE Aurélie (Clermont Ferrand) - Dr BESSE Benjamin (Villejuif) - Dr BLANDIN Sonia (Villefranche sur Saône) - Dr CLEMENT-DUCHENE Christelle (Nancy) - Dr COLINET Benoit (Nancy) - Dr CORTOT Alexis (Lille) - Dr DANIEL Claire (Paris) - Dr DAUBA Jérôme (Mont-de-Marsan) - Dr DOUBRE Hélène (Suresnes) - Dr FOUCHER Pascal (Dijon) - Dr FOURNEL Pierre (St Etienne) - Dr GERVAIS Radj (Caen) - Dr GIRARD Nicolas (Lyon) - Dr GIROUX-LEPRIEUR Etienne (Boulogne Billancourt) - Dr GODBERT Benoît (Nancy) - Dr HAINAUT Pierre (IARC, OMS, Lyon) - Dr LE MOULEC Sylvestre (Paris) - Dr MADROSZYK-FLANDIN Anne (Marseille) - Dr MILLERON Bernard (Paris) - Dr MOLINIER Olivier (Le Mans) - Dr NAGY-MIGNOTTE Hélène (Grenoble) - Dr PAILLOT Nadine (Metz Thionville) - Pr PARIS Christophe (Nancy) - Dr PORTE Henri (Lille) - Dr POUDENX Michel (Nice) - Dr RODIER Jean-Michel (Paris) - Dr SOUQUET Pierre-Jean (Lyon) - Dr TAILLADE Laurent (Paris) - Pr TREDANIEL Jean (Paris) - Dr VINCENT Michel (Lyon) - Pr WISLEZ Marie (Paris) - Pr ZALCMAN Gérard (Caen).

Sous comité « biologie » : Dr BEAU-FALLER Michèle (Strasbourg), Dr CORTOT Alexis (Lille), Dr COURAUD Sébastien (Lyon), Dr GIRARD Nicolas (Lyon), Pr WISLEZ Marie (Paris), Pr ZALCMAN Gérard (Caen).

4. Laboratoire central (sang)

Fondation Jean Dausset - Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH)

Dr Hélène Blanché

27 Rue Juliette Dodu, 75010 Paris

D. Population de l'étude

Tous les cas de cancer broncho-pulmonaire (quel que soit le stade) nouvellement diagnostiqués (cas incidents), chez des patients non-fumeurs recrutés dans les centres investigateurs participants, pouvaient être inclus dans l'étude

1. Critères d'inclusion :

Les critères d'inclusion dans l'étude étaient :

- Patient âgé de 18 ans ou plus au moment du consentement ;
- Patient nouvellement diagnostiqué (à partir de la date d'ouverture du premier centre) pour un cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules ou pour un cancer broncho-pulmonaire indifférencié, qu'il soit prouvé cytologiquement ou histologiquement ;
- Patient se déclarant comme non-fumeur (moins de 100 cigarettes fumées au cours de sa vie) ;
- Patient parlant et comprenant la langue française ; ou patient ne parlant pas ou ne comprenant pas la langue française mais pouvant se faire facilement aider par un interprète de son entourage, dans sa langue maternelle, lors d'un entretien téléphonique ;

- Patient ayant accès à un téléphone, en institution ou à domicile ;
- Patient ayant signé le consentement.

L'inclusion IFCT-1002 BioCAST n'excluait pas les inclusions dans d'autres protocoles de recherche.

Un antécédent de cancer, préalablement traité ou non (quel que soit le traitement) n'était pas un critère de non-inclusion.

2. Critères de non-inclusion :

Les critères d'exclusion étaient :

- Patient fumeur (cigarette) ie ayant fumé plus de 100 cigarettes au cours de sa vie ;
- Patient ayant déjà reçu une éventuelle première cure de traitement par chimiothérapie cytotoxique et/ou thérapie ciblée pour son CBNPC ;
- Patient diagnostiqué avant le démarrage de l'étude (= date d'ouverture du premier centre) : les inclusions rétrospectives n'étaient pas autorisées ;
- Patient non affilié à un régime de Sécurité Sociale ou sans CMU.

3. Nombre d'inclusions attendues

Les projections d'incidence du cancer du poumon en 2010 de l'Institut de Veille Sanitaire (INVS) étaient¹⁰:

- Homme : 26 863 nouveaux cas
- Femme : 10 016 nouveaux cas

Le réseau de « centres inclueurs » de l'IFCT couvre environ 1/3 des nouveaux cas en France¹¹. Environ 85 % des cancers du poumon sont des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules concernés par cette étude (5). Concernant la fréquence du CBNF en Europe on peut retenir les estimations suivantes :

- Europe / US : 10 % chez les hommes atteints d'un cancer broncho-pulmonaire, 15 à 25 % chez les femmes atteintes d'un cancer broncho-pulmonaire (53).
- Bas-Rhin: Hommes : 1,4 %, Femmes : 28,9 % (18).

On peut ainsi procéder au calcul suivant :

- Hommes : ("incidence homme" x "proportion non-fumeur homme") x 0,85 (proportion CBNPC) x 0,33 (proportion estimée centres inclueurs) = 106 à 761 (selon la proportion de non-fumeur utilisée) ;
- Femmes : ("incidence femme" x "proportion non-fumeur femme") x 0,85 (proportion CBNPC) x 0,33 (proportion estimée centres inclueurs) = 421 à 820.

¹⁰ Hospices civils de Lyon / Institut de veille sanitaire / Institut national du cancer / Francim / Institut national de la santé et de la recherche médicale. Projections de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2010. Rapport technique. Avril 2010. <http://www.invs.sante.fr/surveillance/cancers>.

¹¹ Donnée interne à l'IFCT, non publiée.

- Au total, on estime que, sur un an, il est possible de recenser et potentiellement inclure entre 527 et 1581 patients non-fumeurs atteints de CBNPC.

E. Déroulement de l'étude

1. Personnel de santé géographiquement délocalisé du promoteur

Pour accroître l'exhaustivité et la qualité des données, le recueil d'une partie des données cliniques (recherche des facteurs de risque consignés dans le questionnaire « patient ») a été réalisé lors d'un entretien téléphonique entre le patient et un professionnel de santé unique. Cette mesure impliquait la connaissance, à un moment donné, de l'identité du patient et de ses coordonnées. Afin de garantir l'anonymat des patients vis-à-vis du promoteur, ce professionnel de santé était géographiquement délocalisé du promoteur. Il était soumis au secret professionnel. Ainsi, l'identité du patient n'était pas accessible au promoteur. Le seul document permettant d'identifier le patient inclus (copie du formulaire consentement) était détruit par le professionnel de santé après réalisation de l'entretien téléphonique.

2. Mise en place de l'étude

Dans chaque centre participant, chaque investigateur signait une déclaration d'engagement indiquant qu'il respecterait le protocole dans son intégralité. Au moment de la mise en place, tout le matériel nécessaire à l'inclusion des patients lui était remis (formulaires de consentement et d'inclusion, questionnaires « médecin » et kits de prélèvement sanguin).

Il était demandé aux investigateurs de chaque centre de s'engager à effectuer un recrutement le plus exhaustif possible des nouveaux cas de cancer broncho-pulmonaire survenant chez des patients non-fumeurs durant la période du protocole (proposition systématique d'inclusion pendant 1 an).

3. Base de données et traitement de l'information

Une base de données a été créée par l'IFCT. Elle était hébergée par la plateforme sécurisée "Extranet IFCT" (protection par login / mot de passe, échanges de données cryptées par https). Elle était alimentée par le professionnel de santé géographiquement délocalisé du promoteur, sur la base des entretiens téléphoniques avec les patients et la récupération du questionnaire « médecin ». Les données saisies sur la base de données étaient consultables par le promoteur, l'investigateur principal ou son représentant en se connectant sur l'Extranet sécurisé l'IFCT.

4. Déroulement de l'étude

a. Consultation initiale et signature du consentement (visite d'inclusion)

Le médecin du patient (investigateur) était chargé :

- D'informer le patient des objectifs et du déroulement de l'étude ;
- De vérifier que les critères d'inclusion et de non-inclusion étaient respectés ;
- De délivrer au patient la notice d'information, de répondre à ses questions et, si le patient acceptait de participer à l'étude, faire dater et signer le formulaire de consentement en 2

exemplaires. Un exemplaire était remis au patient l'autre était archivé au centre inclueur pour une durée de 15 ans ;

- De remettre le questionnaire « patient » au patient (voir le questionnaire en annexe page 216) afin qu'il puisse le préparer s'il le souhaitait;
- De transmettre par télécopie les formulaires de consentement et d'inclusion au professionnel de santé géographiquement délocalisé du promoteur. Le formulaire de consentement permettait au professionnel de santé de joindre le patient et le formulaire d'inclusion de s'assurer que les critères d'inclusion et de non-inclusion étaient respectés.

Le prélèvement sanguin pouvait avoir lieu ensuite (à l'aide du kit de prélèvement), et c'est à ce moment que l'inclusion devenait effective. Le prélèvement sanguin devait impérativement avoir lieu après signature du consentement mais avant la réalisation d'une éventuelle première cure de traitement par chimiothérapie cytotoxique et/ou thérapie ciblée, à un moment déterminé au choix de l'investigateur et du patient. Il fallait également éviter, pour des raisons logistiques, de réaliser le prélèvement le vendredi et la veille des jours fériés.

b. Inclusion et anonymisation

A réception des formulaires de consentement et d'inclusion, le professionnel de santé géographiquement délocalisé du promoteur :

Attribuait au patient un numéro d'anonymisation qui comportait le code du centre investigateur (3 chiffres) et le numéro d'ordre d'entrée chronologique du patient dans l'étude, dans le centre concerné (3 chiffres) : XXX-YYY. A ce numéro s'ajoutait un code à 2 lettres correspondant aux initiales du patient (Nom-Prénom : ZZ). Il s'agissait d'un moyen de vérification et d'une sécurité pour s'assurer de la traçabilité des données (par exemple en cas d'erreur de report manuscrit du numéro XXX-YYY sur les documents de l'étude) ;

Transmettait le numéro d'anonymisation à l'investigateur par courriel, préférentiellement, ou par télécopie. Ce numéro était ensuite reporté de façon manuscrite sur tous les documents anonymisés se rapportant au patient (questionnaires, feuille d'accompagnement du prélèvement de la Fondation Jean Dausset - CEPH, compte-rendus d'examen...).

c. Prélèvements biologiques

BioCAST prévoyait la constitution d'une collection biologique à partir des prélèvements sanguins réalisés sur les patients inclus dans la cohorte. Ce travail était fait en collaboration étroite avec la Fondation Jean Dausset – CEPH.

Des kits de prélèvement étaient² remis au médecin investigateur à raison d'1 kit/patient inclus. Ce kit comportait 4 tubes :

- 2 tubes EDTA (bouchon violet) de 6 mL ;
- 1 tube « citraté » ACD (bouchon jaune) de 6 mL ;
- 1 tube SST « sec » à séparateur de sérum (bouchon or) de 5 mL.

Chacun des tubes comportait une étiquette à code à barres unique pour chaque patient. Ces étiquettes étaient fournies par la Fondation Jean Dausset – CEPH qui possède son propre système d'anonymisation et d'identification automatisé des prélèvements. Un exemplaire de cette étiquette était apposé sur le formulaire de consentement avant la transmission au professionnel de santé délocalisé afin de garantir la traçabilité des données. Le professionnel de santé délocalisé du promoteur se chargeait de faire le lien entre les deux systèmes d'anonymisation.

Le prélèvement était acheminé à température ambiante par un transporteur agréé (TNT) à la Fondation Jean-Dausset - CEPH (livraison à J + 1). A son arrivé, le prélèvement était :

- enregistré de façon anonyme dans la base de données sécurisée de la Fondation ;
- transformé :
 - à partir des 2 tubes EDTA :
 - isolement du plasma, aliquotage (500 µL/tube), conservation à - 80 °C,
 - isolement du *buffy-coat* pour extraction ultérieure de l'ADN constitutionnel, conservé à - 80°C ;
 - à partir du tube « citraté » ACD : isolement des lymphocytes conservés en azote liquide en vue de l'établissement éventuel de lignées lymphoblastoïdes à partir desquelles sera extrait l'ADN constitutionnel,
 - à partir du tube « sec » : isolement du sérum, aliquotage (500 µL/tube), conservation à - 80°C.

L'étude BioCAST ne prévoyait pas de collecter le tissu tumoral inclus en paraffine qui devaient être archivés dans les centres selon les standards de qualité en vigueur. Toutefois, le Comité Directeur pourra décider de la réalisation d'études spécifiques qui pourront nécessiter le déstockage, l'envoi et la centralisation des blocs. Les frais de déstockage et d'envoi seront alors à la charge du promoteur.

d. Entretien téléphonique avec le patient pour remplissage du questionnaire « patient »

Dès que possible après réception des formulaires de consentement et d'inclusion, le professionnel de santé géographiquement délocalisé du promoteur, contactait le patient par courriel ou téléphone (selon la préférence du patient indiquée sur le formulaire de consentement). Un horaire de rendez-vous téléphonique est convenu pour l'entretien (durée : 30 minutes environ). Un exemplaire du questionnaire pouvait être adressé au patient par courriel ou courrier postal si celui-ci ne lui a pas été remis au cours de la visite d'inclusion ou si le patient l'avait perdu.

L'entretien avait lieu lors du rendez-vous précité. Les réponses du patient étaient saisies directement par le professionnel de santé délocalisé dans la base de données de l'étude. A l'issue de l'entretien le formulaire de consentement sur lequel figuraient les coordonnées du patient était détruit.

e. Questionnaire « médecin » rempli par l'investigateur

L'étude BioCAST prévoyait également un recueil de données à partir d'informations transmises par l'investigateur via un questionnaire « médecin » standardisé (voir le questionnaire en annexe, page 232).

Il comprenait des données sur l'histoire clinique du patient ainsi que le type anatomopathologique de la tumeur, et les résultats des analyses moléculaires éventuellement réalisées auprès de la plateforme selon les référentiels de bonne pratique en vigueur. Le médecin joignait au questionnaire les copies anonymisées des comptes-rendus définitifs d'anatomopathologie et des analyses moléculaires pratiquées sur la plateforme. L'investigateur transmettait par télécopie le questionnaire complété au professionnel de santé délocalisé. Ce dernier saisissait dans la base de données de l'étude les informations contenues dans ce questionnaire.

f. Analyses moléculaires

L'un des objectifs de l'étude BioCAST était de constituer une collection biologique à partir d'une cohorte de patients non-fumeurs atteints d'un CBNPC. Sur proposition du Comité Scientifique (CS) de l'étude, c'est le Conseil d'Administration de l'IFCT (après éventuel avis du CS) qui autorise le déstockage de matériel pour de nouveaux projets scientifiques émergents.

Un projet d'analyse ancillaire était d'ores et déjà retenu et validé lors de l'initiation du projet : développement d'un test multiplex pour le diagnostic des mutations somatiques tumorales de manière non-invasive sur ADN circulant (voir les résultats de cette analyse ancillaire en page 176)

Les recherches des mutations EGFR, ERBB2, BRAF, KRAS, PI3 Kinase et la FISH ALK sur la pièce tumorale sont désormais effectuées en routine par les plateformes de génétique moléculaire (13). Afin de ne pas réaliser ces analyses en doublon, le questionnaire « médecin » comporte un item permettant de préciser les résultats (accompagné d'une copie du compte-rendu).

F. Aspect réglementaire

Cette étude a reçu pour sa mise en œuvre :

- L'avis favorable du Comité de Protection des Personnes (CPP) Sud Est IV le 13/09/2011 ;
- La collection a été déclarée au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche le 1er juillet 2011 ;
- Conformément à la Loi 2004-806 du 9 août 2004 et les textes d'applications subséquents, le promoteur a souscrit une assurance garantissant sa responsabilité civile pour couvrir les éventuelles conséquences préjudiciables de cette étude auprès de la Société Hospitalière d'Assurance Mutuelle, 18 rue Edouard Rochet, 69372 Lyon Cedex 08 (Contrat n° : 134.387).
- Pour la mise en œuvre de la collecte et du traitement informatisé des données, cette étude a obtenu l'avis favorable du Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de Recherche dans le domaine de la Santé (CCTIRS) le 08/09/2011 et l'autorisation de la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL) a été demandée le 23/09/2011.

L'étude BioCAST / IFCT 1002 a été déclarée sur le site internet clinicaltrials.gov sous le numéro NCT01465854.

G. Questionnaires

1. Questionnaire « patient » (voir Annexe B page 216)

Le questionnaire a été élaboré après analyse de la littérature en utilisant, lorsqu'ils existaient, des indicateurs validés ou déjà publiés pour chaque mesure de risque.

Afin de diminuer les biais de remplissage et de classement, le questionnaire était rempli par une seule et même personne, sur la base d'un entretien téléphonique avec le patient.

Données recueillies :

- données démographiques (sexe, mois et année de naissance) ;
- exposition professionnelle :
 - profil des postes occupés successivement (codés ultérieurement avec la Classification Internationale des Types de Professions 2008 (CITP 2008, OIT) et la Nomenclature des Activités Française 2003 (NAF03, INSEE)),
 - recherche des expositions professionnelles au moyen de questions à réponse fermée (élaborées à l'aide du module poumon du questionnaire standardisé mis au point par l'unité INSERM954 (Nancy)) contenant 72 questions (54).
- professions des autres membres du foyer ;
- poids, taille pour le calcul de l'index de masse corporelle ;
- origine géographique :
 - le lieu de naissance (ville, pays),
 - le lieu de naissance des parents et des grands-parents ;
- tabagisme (afin de s'assurer que le patient a fumé moins de 100 cigarettes au cours de sa vie) ;
- tabagisme passif :
 - évalué en paquet-année professionnel et domestique,
 - évalué en fumeur-année professionnel et domestique ;
- consommation de cannabis évalué en joint-année ;
- tabagismes alternatifs (tabac à chiquer, chicha, cigare/cigarillos et pipe) : nombre par jour et durée d'exposition ;
- niveau socio-économique :
 - niveau d'étude,
 - situation socio-professionnelle actuelle,
 - situation familiale ;
- antécédents personnels :
 - déclaratifs sur une liste fermée de pathologies. Cette liste est secondairement « croisée » avec le questionnaire « médecin ». En cas de différence entre les réponses obtenues entre le patient et le médecin ; la réponse du médecin sera retenue,
 - existence d'une maladie professionnelle reconnue par la sécurité sociale,
 - consommation d'alcool : consommation déclarée en nombre de « verres standards » ;

- antécédents familiaux (cancers, maladies génétiques, existence d'un jumeau) ;
- facteurs hormonaux (femme):
 - âge des premières règles,
 - nombre de grossesses et d'enfants biologiques (parité, gestation),
 - âge au premier enfant,
 - antécédents de stimulation ovarienne, de traitement par anti-œstrogène,
 - prise de traitements hormonaux :
 - contraception orale (durée, type, dose d'ethinyloestradiol),
 - traitement hormonal substitutif de la ménopause (durée, type, dose d'estradiol) ;
- exposition environnementale : à partir des différents lieux d'habitation déclarés (adresse / code postal / durée) qui seront couplés, après géo-localisation, aux données cartographiques existantes pour la pollution atmosphérique et l'exposition au radon ;
- exposition aux poussières et fumées domestiques (vapeurs d'huile de cuisine et particules émises par les combustibles solides) :
 - type de chauffage et de cuisson des aliments pour chaque logement,
 - type d'huile utilisée en cuisine,
 - mode cuisson (friture, cuisine sautée) ;
 - exposition au cours des *hobbies*.

2. Questionnaire « médecin » (voir Annexe C page 232)

Afin de favoriser l'exhaustivité des inclusions dans chaque centre, le questionnaire « médecin » était rédigé de manière à pouvoir être complété facilement et rapidement par le médecin investigateur. Il comprenait notamment :

- la date de diagnostic du CBNF ;
- le type tumoral suivant la classification OMS (10) et la classification des adénocarcinomes IASLC/ERS/ATS (11) ;
- le stade de la maladie selon la classification UICC 7ème édition (8) ;
- les antécédents médicaux personnels du patient. Il s'agissait d'une question « doublon » également posée dans le questionnaire « patient » afin de favoriser un recueil de données de qualité. En cas de différence entre les réponses du patient et du médecin, la réponse du médecin était retenue.

H. ARTICLE – Protocole de l'étude BioCAST / IFCT-1002 (Revue des Maladies Respiratoires, 2013)

Couraud S, Labonne S, Missy P, Morin F, Tran Q, Deroy A, Milleron B, Blanché H, Zalcman G, Souquet PJ et les membres du groupe de travail « non-fumeurs »* de l'IFCT. BioCAST: le Bio Observatoire National du Cancer Bronchiques chez les Patients Non-fumeurs (IFCT1002). *Rev Mal Respir*. 2013 Sep;30(7):576-83.

Communication associée (affiche discussion)

Couraud S, Labonne S, Morin F, Tran Q, Missy P, Baudrin L, Blanché H, Zalcman G, Souquet P-J. BioCAST/IFCT-1002 – Le bio observatoire national des cancers bronchiques des non-fumeurs (CBNF). 16ème congrès de pneumologie de langue Française. Janvier 2012. *Rev Mal Respir* 2012 ;29 (Supp 1):A1-A230.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



PROTOCOLE EN COURS

BioCAST : le Bio-observatoire national du cancer bronchiques chez les patients non fumeurs (IFCT1002)[☆]

Lung cancer in never smokers: A French national cohort (BioCAST/IFCT-1002)

S. Couraud^{a,*,b,c}, S. Labonne^{a,b,c}, P. Missy^c, F. Morin^c,
Q. Tran^c, A. Deroy^c, B. Milleron^c, H. Blanché^e,
G. Zalcman^{c,d}, P.-J. Souquet^{a,b,c}, les membres du
Groupe de travail « non-fumeurs de l'IFCT »¹

^a Service de pneumologie et oncologie thoracique, hospices civils de Lyon, centre hospitalier Lyon Sud, 165 chemin du Grand-Revoynet, 69495 Pierre-Bénite cedex, France

^b Faculté de médecine Lyon Sud – Charles Mérieux, université Lyon 1, 69600 Oullins, France

^c Intergroupe francophone de cancérologie thoracique, Paris, France

^d Service de pneumologie et oncologie thoracique, CHU de Caen, Caen, France

^e Centre d'étude du polymorphisme humain–fondation Jean-Dausset, Paris, France

Reçu le 25 janvier 2012 ; accepté le 15 mars 2013

Disponible sur Internet le 18 mai 2013

MOTS CLÉS

Pollution ;
Épidémiologie ;
Polymorphisme ;
Épigénétique ;

Résumé Environ 5 à 25% des cancers bronchopulmonaires (CBP) dans le monde surviennent chez des non-fumeurs (moins de 100 cigarettes dans la vie). Pour beaucoup, il s'agit d'une entité à part en raison de ses particularités cliniques, épidémiologiques et moléculaires. Il s'agit en outre d'un excellent modèle pour l'étude des facteurs de risques de CBP et des mutations tumorales somatiques (habituellement plus fréquentes et singulières dans ce cas). Pourtant, il s'agit d'une forme peu documentée et dont les données proviennent

[☆] Cet article a fait l'objet d'une communication orale au 16^e Congrès de pneumologie de langue française, Lyon – janvier 2012.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : sebastien.couraud@chu-lyon.fr (S. Couraud).

¹ Groupe de travail « Non-Fumeurs » de l'intergroupe francophone de cancérologie thoracique (IFCT) : Dr Arigon Jean-Philippe (Clamart) ; Pr Astoul Philippe (Marseille), Dr Beau-Faller Michèle (Strasbourg) ; Dr Belliere Aurélie (Clermont-Ferrand) ; Dr Besse Benjamin (Villejuif) ; Dr Blandin Sonia (Villefranche-sur-Saône) ; Dr Clement-Duchene Christelle (Nancy) ; Dr Colinet Benoît (Nancy) ; Dr Cortot Alexis (Lille) ; Dr Danel Claire (Paris) ; Dr Dauba Jérôme (Mont-de-Marsan) ; Dr Doubre Hélène (Suresnes) ; Dr Foucher Pascal (Dijon) ; Dr Fournel Pierre (St Etienne) ; Dr Gervais Radj (Caen) ; Dr Girard Nicolas (Lyon) ; Dr Giroux-Leprieur Etienne (Boulogne Billancourt) ; Dr Godbert Benoît (Nancy) ; Dr Hainaut Pierre (Lyon) ; Dr Le Moulec Sylvestre (Paris) ; Dr Madroszyk-Flandin Anne (Marseille) ; Dr Milleron Bernard (Paris) ; Dr Molinier Olivier (Le Mans) ; Dr Nagy-Mignotte Hélène (Grenoble) ; Dr Paillot Nadine (Metz-Thionville) ; Pr Paris Christophe (Nancy) ; Dr Porte Henri (Lille) ; Dr Poudenx Michel (Nice) ; Dr Rodier Jean-Michel (Paris) ; Dr Souquet Pierre-Jean (Lyon) ; Dr Taillade Laurent (Paris) ; Pr Tredaniel Jean (Paris) ; Dr Vincent Michel (Lyon) ; Pr Wislez Marie (Paris) ; Pr Zalcman Gérard (Caen).

Non-fumeur ;
Cancer bronchique

d'études rétrospectives et/ou sur des populations asiatiques alors qu'il s'agit d'une maladie avec une labilité géographique importante. BioCAST/IFCT-1002 est une étude épidémiologique multicentrique nationale dont l'objectif est de décrire les caractéristiques cliniques, moléculaires et génomiques d'une population occidentale de patients non fumeurs atteints de cancer bronchique. Le recueil des données est basé sur un questionnaire standardisé complété lors d'un entretien téléphonique individuel avec le patient et sur des données collectées auprès des investigateurs. Un prélèvement sanguin est réalisé à chaque patient en vue de l'analyse des polymorphismes génomiques sur ADN constitutionnel et de la caractérisation d'anomalies épigénétiques. BioCAST souhaite pouvoir apporter des réponses concrètes aux nombreuses interrogations que suscite cette situation clinique commune.

© 2013 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

KEYWORDS

Pollution
epidemiology;
Genomic
polymorphism;
Epigenetics;
Never smoker;
Lung cancer

Summary Around 5 to 25% of lung cancer worldwide occurs in lifelong non-smokers (less than 100 cigarettes in lifetime). Lung cancer in never smokers (LCINS) shows many clinical, epidemiological and molecular differences compared to those related to tobacco. It is therefore often considered as a separate entity. LCINS is also a good model for the study of lung cancer risk factors and tumoral mutation profiles (usually more common and specific). However, most data has come from retrospective studies and/or from Asian populations, although this disease shows high geographic lability. The BioCAST/IFCT-1002 is a national, multicentric, prospective study promoted by the French intergroup IFCT. The first objective is to describe the clinical and molecular epidemiology of LCINS in a French population. Detailed data (including exposure to many risk factors) are collected directly from the patient through a standardized questionnaire completed during a telephone interview. All patients also undergo blood sampling for the analysis of genomic polymorphisms and the characterization of epigenetic anomalies. BioCAST hopes to provide concrete answers for clinicians and patients about this entity.

© 2013 SPLF. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction et rationnel

Le cancer bronchopulmonaire des non-fumeurs : une entité à part

Dans le monde, environ 5 à 25 % des cancers bronchopulmonaires (CBP) — selon l'origine géographique et le sexe — se développent chez des individus strictement non fumeurs [1,2]. La définition des non-fumeurs (*never smoker* en Anglais) est très stricte. Il s'agit de personnes ayant fumé moins de 100 cigarettes au cours de leur vie. Cette définition ne laisse théoriquement pas de place à la confusion avec les ex-fumeurs (*former smoker*) ayant fumé plus de 100 cigarettes dans leur vie « et » ayant stoppé tout tabagisme depuis au moins un an. Pour beaucoup d'auteurs, le CBP des non-fumeurs (CBNF) est considéré comme une entité distincte en raison, notamment, de ses différences cliniques, épidémiologiques et moléculaires. Si le CBNF était considéré à part, il s'agirait alors de la septième cause de mortalité par cancer dans le monde [3], de l'une des dix premières aux États-Unis [4] et de la neuvième chez les femmes en Europe [5].

Les CBNF sont des cancers survenant chez les femmes, sont très majoritairement des adénocarcinomes et sont beaucoup plus fréquents en Asie par rapport aux États-Unis puis à l'Europe [1,5]. Les observations concernant l'âge moyen de découverte divergent. Les auteurs asiatiques rapportent en effet un âge de survenue plus jeune tandis que les observations françaises tendent à retrouver une plus grande

fréquence chez les sujets âgés [6,7]. Une hypothèse évoquée est qu'il existe possiblement deux pics de fréquence, l'un chez les plus jeunes (en Asie) et l'autre chez les plus âgés, qui pourraient rendre compte de l'exposition à des facteurs de risque différents et donc à des mécanismes de carcinogenèse distincts.

Les facteurs de risque alternatifs au tabagisme actif

Le CBNF constitue en effet un excellent modèle pour l'étude des facteurs de risque de CBP alternatifs au tabac et de nombreux facteurs ont été individualisés. Clément-Duchêne et al. se sont intéressés à l'exposition aux facteurs de risque les plus fréquents auprès de 62 non-fumeurs français. On retrouve une exposition au tabagisme passif chez 79 % des femmes (21 % des hommes) et aux cancérigènes professionnels chez 43 % des hommes (9 % des femmes) [8]. Bien que quantitativement importants, ces deux facteurs de risque n'expliquent pourtant pas la totalité des CBNF puisque dans 40 % de cas chez les hommes et 31 % chez les femmes, aucune exposition à l'un de ces deux facteurs prépondérants n'est retrouvée. D'autres facteurs, parmi ceux connus pour être à risque de CBP, sont donc probablement incriminés dans la genèse de ces cancers. On distingue classiquement les facteurs de risques intrinsèques parmi lesquels figurent les antécédents de cancer bronchique chez un parent au premier degré (particulièrement chez les patients les plus jeunes et en présence de deux cas familiaux ou plus) et

les antécédents personnels de tuberculose, de pneumonie ou de maladie bronchique chronique [9,10] et les antécédents personnels d'irradiation. La prédominance des formes féminines ainsi que la présence de récepteurs à l'œstradiol dans les cancers bronchiques sont deux arguments forts pour le rôle de facteurs hormonaux. Bien que les résultats des études de cohortes et essais prospectifs divergent, il semble bien exister une association entre CBP et exposition aux hormones sexuelles féminines (endogène ou exogène) [5]. Parmi les facteurs extrinsèques, on distingue l'exposition à la pollution environnementale incluant l'exposition au radon ambiant et la pollution atmosphérique — qu'elle soit particulaire ou gazeuse — qui serait responsable de 1,0 à 3,6 % des cas de cancer bronchique en Europe (jusqu'à 7 % chez les non-fumeurs) [11]. L'exposition passive au tabagisme peut être incorporée dans cette catégorie ou bien dans la pollution domestique regroupant également l'inhalation des vapeurs d'huile de cuisson (cuisine frite et/ou sautée) ainsi que des particules émises lors de la combustion des matières solides (charbon, bois) pour la cuisine et/ou le chauffage. Enfin, un bas niveau socioéconomique et la consommation de cannabis sont probablement associés à un risque tandis que la consommation de fruits et légumes et d'aliments à base de soja pourraient être protecteur [1,5,12,13].

Un profil somatique original

L'anomalie la plus connue des CBNF est assurément la grande fréquence des mutations somatiques de l'*epidermal growth factor receptor* (EGFR) dans les tumeurs des individus non fumeurs (45 % versus 7 % chez les fumeurs) et prédisposant à l'efficacité des inhibiteurs de l'EGFR [1,5,14,15]. À l'inverse, les mutations de *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS) sont beaucoup plus fréquentes chez les patients fumeurs et — dans les rares cas où elle est présente chez un non-fumeur — il s'agit alors plus volontiers d'une mutation de type transitions G-A au lieu des transversions G-T habituellement retrouvées chez les fumeurs [16]. Une inversion au niveau du bras court du chromosome 2 peut provoquer la fusion du gène *ALK* avec le gène *EML4*. Le réarrangement des gènes *ALK* (*anaplastic lymphoma kinase*) et *EML4* (*echinoderm microtubule-associated protein-like 4*) au niveau du chromosome 2 est responsable de la création d'une protéine chimérique dotée d'une activité tyrosine-kinase activée en permanence à l'origine d'un signal de prolifération cellulaire. Cette anomalie est présente dans 3 à 7 % des cancers bronchopulmonaires non à petites cellules (CBNPC), particulièrement chez les patients non- ou « petit » fumeurs [17]. *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1* (BRAF) est une kinase liant la GTPase de RAS et constituant la principale cible de cette dernière. Dans les CBP, la fréquence des mutations de BRAF est de l'ordre de 1 à 3 % et il semble que cette mutation soit beaucoup plus commune chez les fumeurs [18]. Les mutations de *KRAS*, *EGFR*, *BRAF* et les réarrangements *EML4-ALK* semblent mutuellement exclusives. Ainsi, les profils moléculaires somatiques des CBNF semblent donc bien originaux par rapport à ceux induits par les carcinogènes de la fumée du tabac. La quasi-spécificité de certains spectres mutationnels ainsi que l'exclusion mutuelle de la plupart des principales anomalies sont des arguments forts en faveur

de l'existence de deux voies d'oncogenèse différentes en fonction de l'exposition, ou non, au tabac.

La singularité des anomalies génomique des cancers bronchopulmonaires des non-fumeurs

L'analyse des familles à risque puis les études génomiques à haut débit ont permis d'identifier des anomalies géniques selon le statut tabagique. Les études génomiques à haut débit ont permis d'identifier des loci chromosomiques d'intérêt, semblant être liés au risque de cancer bronchique. Certains de ces loci sont plus spécifiques des non-fumeurs. Le premier locus identifié, 6q23-25, est associé au gène *RGS17* (*regulator of G-protein signaling 17*, impliqué in vitro dans la prolifération tumorale) et semble conférer un risque de cancer tout particulièrement chez les non-fumeurs [19]. Le locus 5p15.33 contenant notamment le *telomerase reverse transcriptase* (TERT) semble également directement lié au risque de cancer bronchique en particulier chez la femme asiatique non fumeuse [20]. De même, les récentes avancées en matière de génétique moléculaire et de bio-informatique ont permis la recherche de polymorphismes génomiques liés au risque de CBP. Dans cette approche, on distingue classiquement trois familles de gènes impliqués dans la susceptibilité au CBP chez les non-fumeurs : ceux des voies de métabolisme des cancérigènes, ceux de la réparation de l'ADN ou encore ceux des voies de l'inflammation [5]. À titre d'exemple, le génotype GG du gène *MLH1* (*mutL homolog 1, colon cancer, non polyposis type 2*) est associé à un risque de cancer bronchique chez les patients non-fumeurs uniquement (OR = 1,64 [1,10–2,44]) ; ce risque semblant être modulé par l'exposition au tabagisme passif [21]. De même, une étude rapporte un lien entre une condition de syndrome inflammatoire bronchique chronique (tuberculose, atopie, asthme, expectoration chronique), des polymorphismes de certains gènes de l'inflammation (*IL-1* ou *IL-6*) et le risque de cancer bronchique suggérant un rôle de l'inflammation chronique dans l'oncogenèse [22].

Le CBNF constitue donc une entité à part — très fréquente en Asie et moins en Europe — mais malheureusement toujours de pronostic très sévère. Cette entité est également un modèle original pour l'étude des facteurs de risques épidémiologiques et génétiques, non liés au tabac, des CBP. En outre, sa grande fréquence et son spectre original des mutations tumorales en font un outil intéressant pour l'étude des marqueurs tumoraux prédictifs de la réponse à certaines thérapies ciblées. Le CBNF est pourtant très mal connu. La plupart des données le concernant proviennent d'analyses de sous-groupes, d'études rétrospectives, de cohortes de petits effectifs et — bien souvent — sur des populations asiatiques alors que l'on a montré la grande labilité géographique de cette entité. Afin de fournir des réponses concrètes aux questions légitimes des patients et des soignants, souvent démunis face à cette situation clinique pourtant désormais commune, l'Intergroupe francophone de cancérologie thoracique (IFCT) a souhaité promouvoir l'étude BioCAST (Bio-Observatoire des cancers bronchiques du non-fumeur) dont la présentation du protocole est l'objet de cet article.

Méthode et population

BioCAST/IFCT-1002 est une étude épidémiologique de cohorte, prospective, multicentrique, associée à une collection d'échantillon sanguin systématique.

L'objectif principal est de décrire les caractéristiques cliniques, moléculaires et génomiques d'une cohorte de patients non fumeurs atteints d'un cancer bronchique. Les objectifs secondaires sont d'individualiser — au sein de cette cohorte — des phénotypes cliniques (intégrant l'exposition aux facteurs de risque) et/ou biologiques (mutations somatiques et polymorphismes génomiques) en outre.

Population de l'étude

BioCAST propose d'inclure tous les CBNPC nouvellement diagnostiqués chez des patients authentiquement non fumeurs (ayant fumé moins de 100 cigarettes au cours de leur vie). Les critères d'inclusion des patients sont :

- patient ayant signé le consentement et âgé de 18 ans ou plus au moment du consentement ;
- patient nouvellement diagnostiqué pour un CBNPC ou pour un cancer bronchique indifférencié, qu'il soit prouvé cytologiquement ou histologiquement ;
- patient se déclarant comme non-fumeur (moins de 100 cigarettes fumées dans la vie) ;
- patient parlant et comprenant la langue française ou pouvant se faire facilement aider d'un interprète de son entourage, dans sa langue maternelle, lors d'un entretien téléphonique ;
- patient ayant accès à un téléphone, en institution ou à domicile ;
- l'inclusion dans le BioCAST n'exclut pas les inclusions dans d'autres protocoles de recherche.

Les critères d'exclusion sont :

- patient fumeur (cigarette) i.e. ayant fumé plus de 100 cigarettes dans sa vie ;
- patient non-fumeur déjà en cours de traitement pour son cancer bronchique (l'inclusion rétrospective de patient n'est pas autorisée).

En France, les projections de l'incidence du cancer bronchique en 2010 sont de 26 863 cas pour les hommes et 10 016 cas pour les femmes selon l'Institut national de veille sanitaire [23]. Le promoteur estime que le réseau de centres investigateurs de cette étude couvre environ un tiers des nouveaux cas de cancer bronchique en France. On estime qu'environ 85 % des cancers bronchiques sont des CBNPC concernés par cette étude. Les données concernant la fréquence du CBNPC chez les non-fumeurs en Europe sont rares. Selon Sun et al., elle serait d'environ 10 % des CBNPC chez l'homme et de 15 à 25 % chez la femme [1]. En France, l'étude du registre des cancers du Bas-Rhin retrouve des taux de 1,4 % des hommes et 28,9 % des femmes [24]. À l'aide de ces données, il est possible d'estimer le nombre de patients inclusibles durant un an : 106 à 761 hommes et 421 à 709 femmes soit un total de 527 à 1581 patients. Cela ferait de la série BioCAST, l'une des plus importantes collections mondiales de cancer bronchique du non-fumeur établie de manière prospective. Lors des mises en place, les centres

investigateurs de l'étude BioCAST ont évalué leur potentiel d'inclusion à 892 patients.

Déroulement de l'étude

Dans chaque centre ayant accepté de collaborer à l'étude, il est demandé aux investigateurs d'essayer d'assurer un recueil le plus exhaustif possible des nouveaux cas de CBNF durant la période du protocole (un an).

Le patient est informé par le médecin investigateur de l'existence, des modalités, des risques et des bénéfices de l'étude. S'il l'accepte, il lui est proposé de signer le formulaire de consentement et d'être inclus dans BioCAST. Ce document est ensuite transmis par télécopie à un professionnel de santé géographiquement délocalisé du promoteur (PSGD, cf. ci-après) qui enregistre le patient — de manière anonyme — dans un système Extranet sécurisé. Une fois inclus, le patient se prête à la réalisation d'un prélèvement sanguin en outre et se voit remettre un « questionnaire patient » vierge afin d'en préparer les réponses à ce dernier et de minimiser ainsi le biais de mémorisation. Pour diminuer le biais de remplissage et de classement des données obtenues auprès des patients, la saisie des réponses à ce questionnaire patient standardisé est confiée à un professionnel de santé unique. Après l'inclusion, celui-ci prend un rendez-vous téléphonique avec le patient à une date qui lui convient. Cet entretien peut bien entendu être différé ou reporté au gré du patient. Cette mesure implique la connaissance, à un moment déterminé, de l'identité du patient et de ses coordonnées. Afin de garantir l'anonymat des patients vis-à-vis du promoteur, ce professionnel de santé est donc géographiquement délocalisé du promoteur (PSGD). Il est soumis au secret professionnel. L'identité des patients n'est ainsi pas accessible directement au promoteur.

Ce questionnaire destiné au patient a été élaboré après analyse de la littérature en utilisant, lorsqu'ils existent, des indicateurs validés pour chacune des mesures d'exposition aux risques :

- l'évaluation de l'exposition professionnelle utilise un questionnaire développé par l'équipe Inserm U954 de Nancy [25]. Ce questionnaire recueille notamment pour chaque emploi, le métier, l'activité et l'employeur. Ces données sont ensuite classées à l'aide de la nomenclature française et internationale : classification Internationale des types de professions 2008 de l'Organisation internationale du travail et nomenclature des activités française 2003 de l'Institut national de la statistique et des études économiques. Le questionnaire évalue également les risques spécifiques d'exposition professionnelle au travers de 70 questions ciblées. En cas de réponse positive à l'une d'elles, le patient est invité à se prononcer sur l'intensité du risque. Pour terminer, une question évalue si le patient est reconnu en maladie professionnelle par la sécurité sociale française. La profession des parents et du conjoint est également renseignée ;
- l'index de masse corporelle, l'âge au diagnostic et le sexe sont renseignés ;
- l'origine géographique est déterminée par le lieu de naissance du patient, de ses parents et de ses grands parents ;
- le niveau socioéconomique est estimé à l'aide de plusieurs facteurs : le niveau d'étude, la situation

socioprofessionnelle actuelle, l'adresse du logement ainsi que la situation familiale actuelle ;

- le tabagisme passif est évalué en paquet-année passif et en fumeur-année (un fumeur dans l'entourage direct pendant un an). L'exposition doit être supérieure à un an pour être relevée. La mesure distingue les tabagismes passifs domestiques (dans l'enfance et à l'âge adulte) et professionnelles ;
- la recherche d'une intoxication directe au cannabis est également recherchée bien que celle-ci soit habituellement très liée à la consommation de cigarettes manufacturées. Elle est mesurée en joint-année (un joint/jour pendant un an) ;
- les antécédents médicaux personnels du patient sont également recueillis sur une liste fermée de pathologie comprenant entre autres, les antécédents tuberculeux, d'infections respiratoires ou de trouble ventilatoire obstructif. Une question spécifique recherche des antécédents néoplasiques personnels avec la date de diagnostic, le type de cancer et son traitement. Cet item fait également partie des données recueillies auprès de l'investigateur afin d'en garantir l'exhaustivité et la qualité ;
- les antécédents familiaux de cancer sont également recueillis en précisant — pour chaque cas au premier degré — le type de cancer et l'âge de survenue ;
- la notion d'antécédent familial de maladie génétique et son type est renseigné ;
- la consommation d'alcool est mesurée par la consommation déclarée d'alcool en nombre de « verres standards » ;
- une partie du questionnaire concerne spécifiquement les femmes et leur exposition aux facteurs hormonaux endogènes : âge de la ménopause, âge aux ménarches, parité, nombre de grossesse, âge au premier enfant, antécédents de stimulation ovarienne et de traitement par anti-estrogène. Pour l'apport exogène, la recherche de prise d'hormones de synthèse est systématiquement recueillie : type et durée de chaque contraceptif oral et de chaque traitement hormonal substitutif de la ménopause. Un index comprenant une liste exhaustive de ces traitements est fourni en appendice du questionnaire. Elle permet au PSGD de renseigner — lors de l'entretien — la dose d'œstradiol reçue ;
- l'exposition environnementale est évaluée grâce au renseignement de chaque lieux d'habitation (adresse/code postal/date et durée). Ces données seront couplées aux données de veille concernant la pollution atmosphérique et l'exposition au radon environnementale ;
- l'exposition à la pollution domestique est évaluée :
 - pour les vapeurs d'huile de cuisine en plat-année (cuisson en friture ou sauté de un plat par jour pendant un an),
 - pour les fumées de combustion de chauffage et de cuisine, de manière déclarative pour chaque logement.

Pour compléter les données recueillies auprès des patients, BioCAST prévoit également de collecter des données auprès des médecins investigateurs et notamment :

- le type tumoral suivant la classification de l'Organisation mondiale de la santé [26] et la Classification internationale multidisciplinaire des adénocarcinomes [27]. La copie anonyme du compte-rendu de l'analyse

anatomopathologique et immuno-histochimique est également collectée ;

- le stade de la maladie selon la classification UICC 7^e édition [28] ;
- une copie anonymisée du compte-rendu des analyses moléculaires tumorales réalisées de manière systématique sur les plateformes de l'Institut national du cancer (et comprenant notamment *EGFR*, *BRAF*, *KRAS* et *EML4-ALK*) [29] ;
- le volume expiratoire maximal en une seconde (VEMS) exprimé en millilitres puis en pourcentage de la valeur théorique ainsi que le rapport du VEMS à la capacité vitale forcée (CVF), exprimée en pourcentage ;
- les antécédents médicaux personnels du patient. Il s'agit d'une question « doublon » également posée au patient et destinée à favoriser la qualité du recueil. De plus, certaines précisions médicales (formes cliniques, types de traitement...) sont considérés ici.

Lorsqu'il est inclus, et avant tout traitement anti-néoplasique, le patient se prête à la réalisation d'un prélèvement de sang veineux (quatre tubes de 7 mL). Les quatre tubes sont acheminés — par transporteur agréé — au laboratoire central de l'étude situé au Centre d'étude du polymorphisme humain—Fondation Jean-Dausset (CEPH). L'acheminement est effectué à température ambiante et dans un délai maximal de 24 heures. Pour une collecte sur les sites investigateurs au jour J, la livraison au laboratoire central a donc lieu à J+1, au matin. Les prélèvements livrés à J+1 sont immédiatement traités comme suit :

- tubes EDTA ($n=2$) :
 - isolement du plasma, aliquotage (500 μ L/tube), conservation à -80°C en outre,
 - et isolement du *buffy-coat* pour extraction ultérieure de l'ADN constitutionnel et conservation à -80°C ;
- tube « citraté » ACD ($n=1$) : isolement des lymphocytes et conservation en azote liquide pour l'établissement éventuel de lignées lymphoblastoïdes ;
- tube « sec » : isolement du sérum, aliquotage (500 μ L/tube), conservation à -80°C .

BioCAST prévoit également un référencement des échantillons tumoraux en vue d'éventuelles études ultérieures. Ces derniers pourront être collectés dans un second temps en cas de nécessité. Les échantillons ainsi collectés seront ensuite intégrés à plusieurs études associées. Une recherche de polymorphisme génomique (*single nucleotide polymorphism* [SNP]) sur ADN constitutionnel sera réalisée — en collaboration avec le CEPH — à l'aide de puce haut débit. L'analyse sera particulièrement focalisée sur les gènes connus pour être impliqués la susceptibilité au CBP chez les non-fumeurs. Pour cette analyse, la cohorte pourra être comparée à des cohortes d'individus fumeurs provenant des collections du CEPH. Enfin, les données de cette analyse seront couplées aux données cliniques et épidémiologiques pour la recherche de groupes homogènes au sein de la cohorte de non-fumeur, dans le but d'établir des corrélations entre génotype, exposition aux facteurs de risque, profil des mutations tumorales et caractéristiques anatomocliniques.

Une analyse des anomalies épigénétiques, potentiellement impliquées dans le déterminisme du cancer bronchique

est également prévue en collaboration avec l'UMR Inserm 1086 (Caen). Elle se concentrera particulièrement sur l'hyperméthylation des promoteurs ainsi que sur les micro-ARN (mir-21 notamment). Enfin, en collaboration avec le Centre international de recherche sur le cancer, une étude pilote de faisabilité d'un test diagnostique des mutations tumorales à partir de l'ADN plasmatique (intégrant donc une fraction d'ADN tumoral) sera réalisée. En fonction des résultats et de la quantité de matériel restant disponible, le comité directeur de l'étude pourra autoriser d'autres projets sur la collection (sauf opposition du patient).

Inclusion des petits fumeurs

Le terme de « petits fumeurs » (*light smokers*), bien que fréquemment employé, ne fait l'objet d'aucune définition consensuelle. Dans un article récent, Varghese et al. ont montré que le profil mutationnel des petits-fumeurs (définis comme ceux ayant fumé moins de cinq paquet-années et sevrés depuis au moins 15 ans) était plus similaire à celui des ex-fumeurs qu'à ceux des non-fumeurs [30]. Nous avons décidé d'élargir l'inclusion aux petits-fumeurs, définis comme ci-dessus. À cet effet, un amendement a été déposé par l'investigateur-coordonnateur de l'étude et accepté par le conseil d'administration du promoteur en date du 28 juin 2012 et déclaré au Comité consultatif sur le traitement de l'information en matière de recherche dans le domaine de la santé (CCTIRS).

L'objectif de cet amendement est de déterminer que les « petits fumeurs » peuvent être considérés comme des non-fumeurs sur le plan clinique, épidémiologique et moléculaire, ou au contraire, doivent être considérés comme des fumeurs. De même, ces données pourraient être utilisées pour proposer une définition de cette entité, basée sur sa comparaison avec les non-fumeurs et avec les données de la littérature concernant les fumeurs.

Aspects éthiques et réglementaires

BioCAST a reçu l'avis favorable du Comité de protection des personnes (CPP) Sud-Est IV le 13/09/2011. La collection a été déclarée au ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche le 1^{er} juillet 2011. Conformément à la loi 2004-806 du 9 août 2004 et les textes d'applications subséquents, le promoteur a souscrit une assurance garantissant sa responsabilité civile pour couvrir les éventuelles conséquences préjudiciables de cette étude auprès de la Société hospitalière d'assurance mutuelle, 18, rue Édouard-Rochet, 69372 Lyon cedex 08 (Contrat n° : 134.387). Pour la mise en œuvre de la collecte et du traitement informatisé des données, cette étude a obtenu l'avis favorable du CCTIRS le 08/09/2011 et l'autorisation de la Commission nationale de l'informatique et des libertés (CNIL) a été demandée le 23/09/2011. Enfin, l'étude est déclarée sur le site clinical-trials.gov sous le numéro NCT01465854.

Le financement de cette étude a été obtenu auprès de partenaires industriels.

Les patients sont informés du caractère volontaire de leur participation, de leur possibilité d'interrompre leur participation sans avoir l'obligation d'en fournir la raison, ni que cela interfère sur la qualité de la relation avec le

personnel soignant. Ils sont également informés de l'étude de leur patrimoine génétique constitutionnel, de la conservation sans limitation de durée des prélèvements sanguins et de leurs produits et de leur possible transmission à d'autres institutions, y compris aux États-Unis d'Amérique. Chaque patient est informé de ses possibilités d'opposition à tout ou partie de ce processus. Un exemplaire du consentement écrit est délivré au patient, un autre est conservé dans le classeur investigateur du centre.

Analyse statistique

Le premier temps de l'analyse statistique sera descriptif. L'exposition aux facteurs de risque sera exprimée avec le ou les indicateurs validés lorsqu'ils existent. Les variables continues seront d'abord exprimées à l'aide de leur valeur médiane ou moyenne — selon les cas — et de leur variable de dispersion associée (intervalle interquartile ou écart-type respectivement). À l'aide des calculs de quartiles, les variables continues seront regroupées en classes comme appropriés. Les variables catégorielles seront exprimées en pourcentage associées à leur intervalle de confiance à 95 % correspondant.

L'analyse de cluster est une méthode éprouvée permettant de classer de manière objective des patients en sous-groupes homogènes [31]. Habituellement utilisée dans le domaine des analyses génomiques, cette technique peut être utilisée pour déterminer des formes cliniques [32], des groupes de symptômes [33] ou de patient [34]. L'analyse de *cluster* sera utilisée pour déterminer — au sein de la cohorte de CBNF — des groupes homogènes de patient sur la base de leur exposition aux facteurs de risque, de leurs caractéristiques cliniques, anatomopathologiques et immuno-histochimiques. Dans un second temps, l'analyse sera complétée en intégrant les données issues de l'analyse de polymorphisme. Cette approche devrait permettre d'individualiser plusieurs groupes de patients présentant un CBNF en relation avec une exposition à un facteur de risque donné et présentant, de manière homogène dans le sous-groupe, une ou plusieurs caractéristique clinicobiologique permettant de l'identifier au sein de l'ensemble hétérogène des CBNF. Ainsi, cette analyse permettra par exemple, de préciser les caractéristiques associées aux mutations tumorales et de guider leur recherche systématique.

Les différences entre les clusters ainsi identifiés seront évaluées à l'aide du test *t* ou de l'analyse des variances selon le nombre de classe et pour les variables continues normalement distribuées. Les variables avec une distribution asymétrique seront comparées par tests non paramétriques pour échantillons indépendants (Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis selon le nombre d'échantillons). Le test du χ^2 sera utilisé pour les variables catégorielles. La recherche de corrélation entre variables utilisera les coefficients de Pearson (variables continues) ou de Spearman (en présence de variable ordinale ou de petits effectifs). Nous utiliserons ensuite une régression linéaire simple (non ajustée) puis un modèle linéaire multivariable ajusté pour décrire la relation entre deux variables corrélées. Tous les tests seront réalisés avec un seuil de signification de 0,05.

Résultats attendus et discussion

L'étude BioCAST souhaite apporter des réponses concrètes aux médecins et aux patients confrontés à cette situation clinique devenue commune. Cent centres investigateurs sont ouverts au recrutement. Les inclusions seront clôturées au 31 janvier 2013.

La principale faiblesse de cette étude est l'absence de contrôles contemporains (fumeurs). Toutefois, la population de BioCAST pourra être comparée aux données historiques et de la littérature dans un premier temps. À titre d'exemple, l'étude KBP-2010, promue par le Collège de pneumologues des hôpitaux généraux (CPHG), a recueilli à l'inclusion un nombre de données similaires et pourrait fournir une population de référence acceptable [35]. De plus, l'analyse de cluster permet d'identifier différents groupes homogènes au sein d'une population. Ces groupes peuvent ensuite être comparés entre eux ou à la population restante réalisant un autocontrôle. Pour terminer, la recherche de polymorphisme sera comparée à des cohortes de patients fumeurs atteints de CBP dont dispose le CEPH. Au total, et bien que le manque de contrôle soit un élément déterminant ne devant pas être minimisé, l'analyse de cette cohorte devrait donner des résultats robustes.

Cette étude pourrait rencontrer deux autres faiblesses. En premier lieu, il n'est pas prévu de s'assurer de l'exhaustivité des cas inclus dans chaque centre. À ce titre, il ne sera pas possible de fournir des données d'incidence ou de prévalence (ce qui n'était pas l'objectif). En second lieu, les premiers retours des centres investigateurs semblent montrer que le statut de « non-fumeur » est plus rarement rencontré qu'espéré. En effet, le caractère très strict de la définition exclut de facto un grand nombre de patient, initialement étiqueté non-fumeur par l'investigateur. Dans ces conditions l'effectif final pourrait être plus faible qu'escompté, mais la qualité de la sélection des patients (< 100 cigarettes dans la vie *strictement*) constituera in fine une force de cette étude.

BioCAST devrait confirmer des données bien connues : la prédominance féminine, et d'adénocarcinomes, de même que le rôle de l'exposition au tabagisme passif chez les femmes et aux carcinogènes professionnels chez les hommes. Mais les résultats permettront aussi d'obtenir des données originales comme l'âge au diagnostic ou des informations sur certains facteurs de risque moins connus en France (tels que l'exposition aux fumées domestiques, à la pollution atmosphérique, aux facteurs hormonaux ou à certaines pathologies).

Sur le plan moléculaire, cette étude devrait permettre de mieux redéfinir les facteurs cliniques, pathologiques et épidémiologiques associés à la présence de certaines mutations somatiques, permettant ainsi de mieux les détecter. L'analyse de cluster permettra en outre de redessiner le paysage des formes de CBNF. Enfin, les analyses secondaires (polymorphismes, épigénétique, mutations somatiques sur ADN circulant) constituent autant d'approche inédite dans le domaine.

Ce projet collaboratif national se focalise donc sur une entité dont l'étude constitue un intérêt récent et majeur. Il devrait permettre de fournir des réponses concrètes à de nombreuses questions concernant cette pathologie. Les premiers résultats sont attendus fin 2013.

Déclaration d'intérêts

Au cours des cinq dernières années, Sébastien Couraud a perçu des honoraires ou financements pour participation à des congrès, communications, participation à des groupes d'experts, travaux de recherche, de la part des Laboratoires/entreprises : Lilly, Roche, Astra Zeneca, Boehringer, Pierre Fabre, Glaxo Smith Kline.

Au cours des cinq dernières années, Gérard Zalcman a perçu des honoraires ou financements pour participation à des congrès, travaux de recherche, de la part des Laboratoires/entreprises : Lilly.

Références

- [1] Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers — a different disease. *Nat Rev Cancer* 2007;7:778–90.
- [2] Ferlay J, Shin H-R, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893–917.
- [3] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74–108.
- [4] Thun MJ, Henley SJ, Burns D, et al. Lung cancer death rates in lifelong nonsmokers. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:691–9.
- [5] Couraud S, Zalcman G, Milleron B, et al. Lung cancer in never smokers — a review. *Eur J Cancer* 2012;48:1299–311.
- [6] Kawaguchi T, Takada M, Kubo A, et al. Gender, histology, and time of diagnosis are important factors for prognosis: analysis of 1499 never-smokers with advanced non-small cell lung cancer in Japan. *J Thorac Oncol* 2010;5:1011–7.
- [7] Quoix E, Monnet I, Scheid P, et al. Management and outcome of French elderly patients with lung cancer: an IFCT survey. *Rev Mal Respir* 2010;27:421–30.
- [8] Clément-Duchêne C, Vignaud JM, Stoufflet A, et al. Characteristics of never smoker lung cancer including environmental and occupational risk factors. *Lung Cancer* 2010;67:144–50.
- [9] Lissowska J, Foretova L, Dabek J, et al. Family history and lung cancer risk: international multicentre case-control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses. *Cancer Causes Control* 2010;21:1091–104.
- [10] Brenner DR, McLaughlin JR, Hung RJ. Previous lung diseases and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2011;6:e17479.
- [11] Trédaniel J, Aarab-Terrisse S, Teixeira L, et al. Atmospheric air pollution and lung cancer: epidemiologic data. *Rev Mal Respir* 2009;26:437–45.
- [12] Büchner FL, Bueno-de-Mesquita HB, Linseisen J, et al. Fruits and vegetables consumption and the risk of histological subtypes of lung cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Cancer Causes Control* 2010;21:357–71.
- [13] Yang G, Shu XO, Chow WH, et al. Soy food intake and risk of lung cancer: evidence from the Shanghai Women's Health Study and a meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2012;176:846–55.
- [14] Schwartz AG, Prysak GM, Bock CH, et al. The molecular epidemiology of lung cancer. *Carcinogenesis* 2007;28:507–18.
- [15] Subramanian J, Govindan R. Molecular genetics of lung cancer in people who have never smoked. *Lancet Oncol* 2008;9:676–82.
- [16] 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.
- [17] Fukui T, Yatabe Y, Kobayashi Y, et al. Clinicoradiologic characteristics of patients with lung adenocarcinoma harboring EML4-ALK fusion oncogene. *Lung Cancer* 2012;77:319–25.

- [18] Paik PK, Arcila ME, Fara M, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol* 2011;29:2046–51.
- [19] Amos CI, Pinney SM, Li Y, et al. A susceptibility locus on chromosome 6q greatly increases lung cancer risk among light and never smokers. *Cancer Res* 2010;70:2359–67.
- [20] 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.
- [21] Lo YL, Hsiao CF, Jou YS, et al. Polymorphisms of MLH1 and MSH2 genes and the risk of lung cancer among never smokers. *Lung Cancer* 2011;72:280–6.
- [22] 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.
- [23] Institut national de veille sanitaire, Institut national du cancer, Réseau Français des Registres de Cancer FRANCIM, Hospices Civils de Lyon, CépIDC Inserm. Projections de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2010. [Internet]. 2010 Apr p. 75. Available from: <http://www.invs.sante.fr/applications/cancers/projections2010/rapport-projections-nationales-cancer-2010.pdf>
- [24] Foeglé J, Hédelin G, Lebitasy MP, et al. Specific features of non-small cell lung cancer in women: a retrospective study of 1738 cases diagnosed in Bas-Rhin between 1982 and 1997. *J Thorac Oncol* 2007;2:466–74.
- [25] Wild P, Gonzalez M, Bourgkard E, et al. Occupational risk factors have to be considered in the definition of high-risk lung cancer populations. *Br J Cancer* 2012;106:1346–52.
- [26] Travis W, Brambilla E, Müller-Hemerlinck H. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and Heart. Lyon: IARC Press; 2004.
- [27] 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.
- [28] Groome PA, Bolejack V, Crowley JJ, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2007;2:694–705.
- [29] Nowak F, Soria JC, Calvo F. Tumour molecular profiling for deciding therapy-the French initiative. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9:479–86.
- [30] Varghese AM, Sima CS, Chaff JE, et al. Lungs don't forget: Comparison of the KRAS and EGFR mutation profile and survival of collegiate smokers and never smokers with advanced lung cancers. *J Thorac Oncol* 2013;8:123–5.
- [31] Frades I, Matthiesen R. Overview on techniques in cluster analysis. *Methods Mol Biol* 2010;593:81–107.
- [32] Van Rooden SM, Heiser WJ, Kok JN, et al. The identification of Parkinson's disease subtypes using cluster analysis: a systematic review. *Mov Disord* 2010;25:969–78.
- [33] Hénoc I, Ploner A, Tishelman C. Increasing stringency in symptom cluster research: a methodological exploration of symptom clusters in patients with inoperable lung cancer. *Oncol Nurs Forum* 2009;36:E282–92.
- [34] Newcomer SR, Steiner JF, Bayliss EA. Identifying subgroups of complex patients with cluster analysis. *Am J Manag Care* 2011;17:e324–32.
- [35] Grivau M, Locher C, Bombaron P, et al. Study KBP-2010-CPHG: inclusion of new cases of primary lung cancer diagnosed in general hospital pneumology departments between 1st January and 31 December 2010. *Rev Pneumol Clin* 2010;66:375–82.

I. Evolution des inclusions

Au total, l'étude BioCAST disposait de 75 centres actifs (au moins une inclusion) répartis sur toute la France et ayant ouverts progressivement au cours de la période de l'étude (Figure 11, Figure 12, Figure 13).

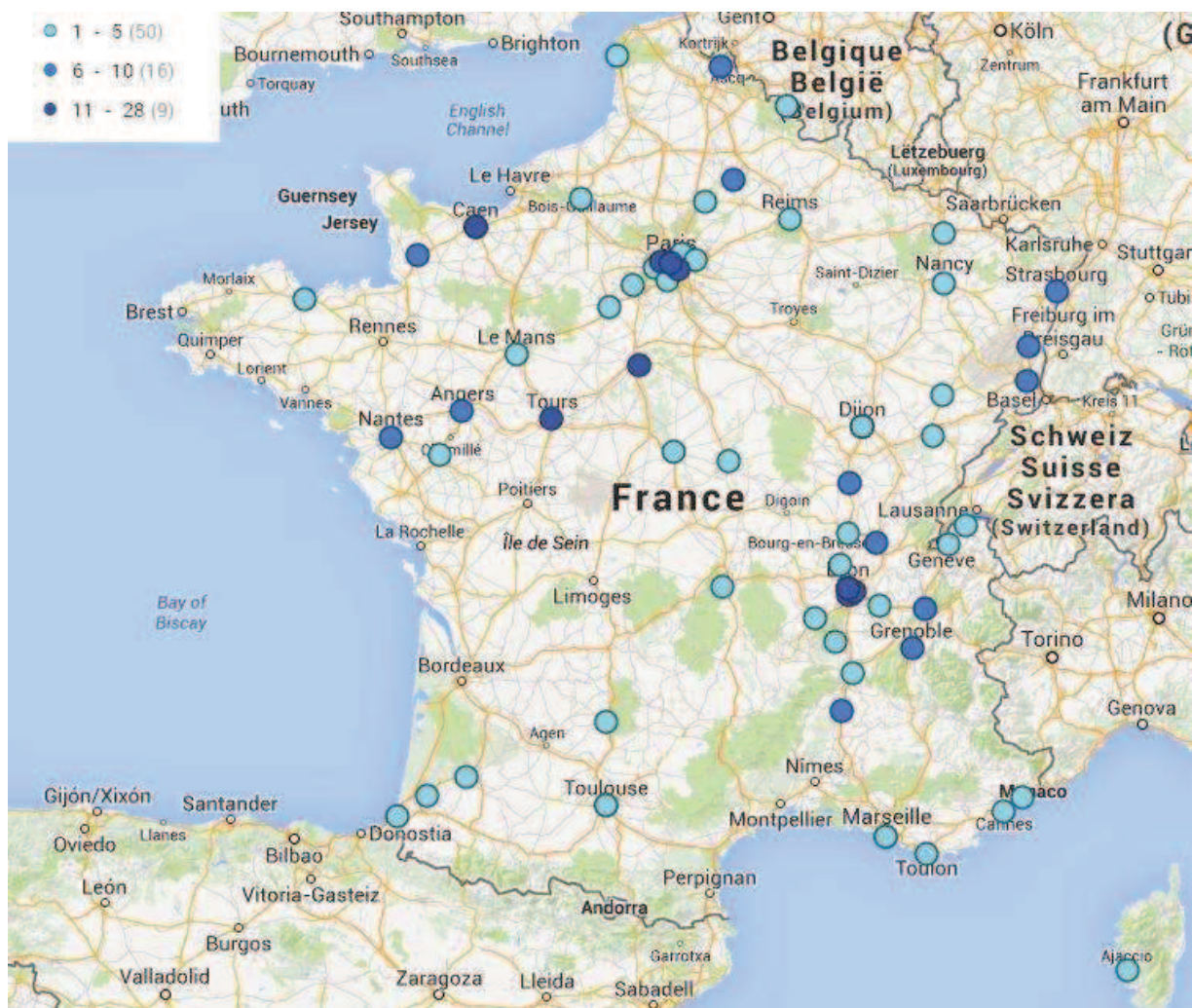


Figure 11 - Carte des centres participants et actifs indiquant le niveau d'inclusion

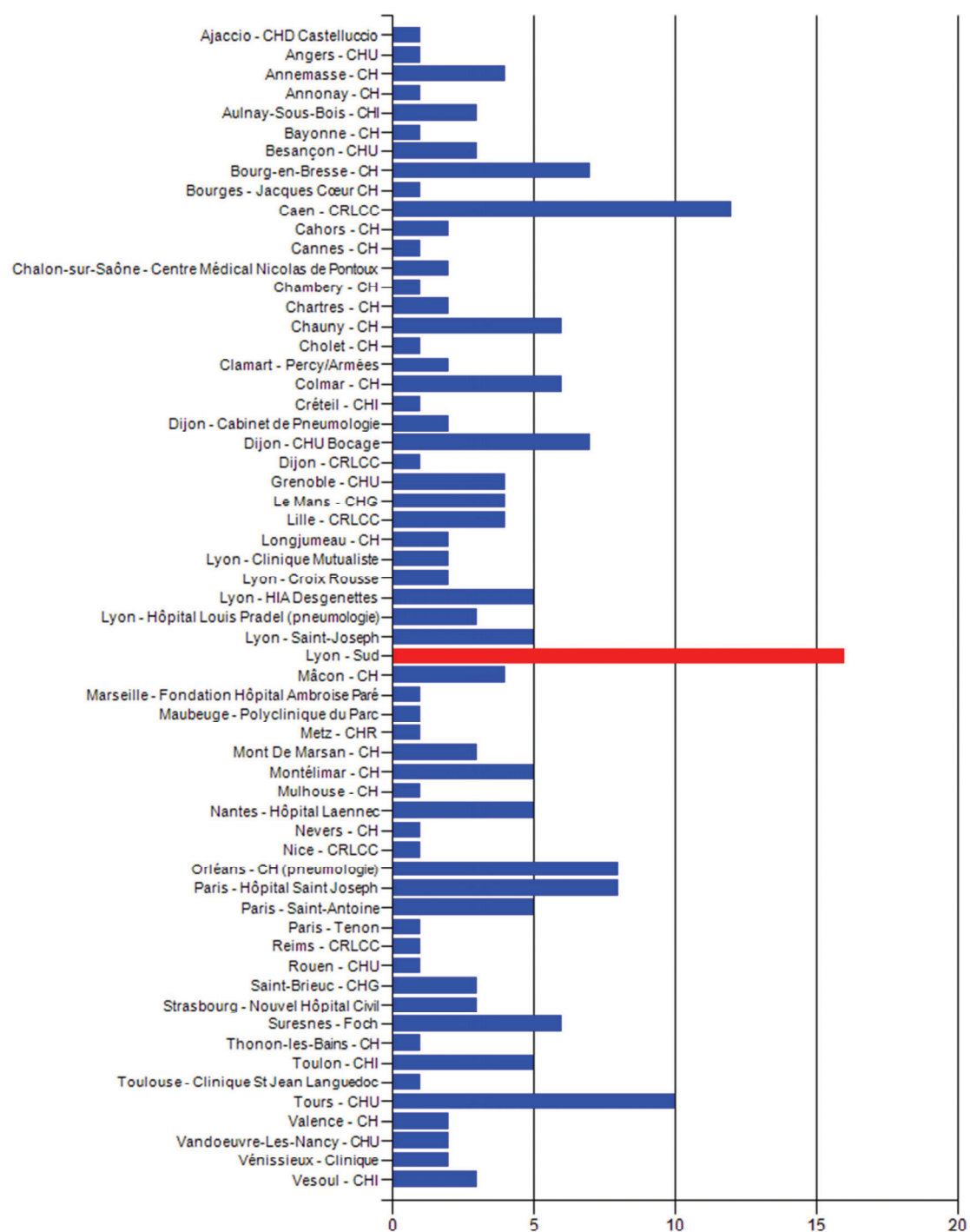


Figure 12 - Détails des inclusions dans chacun des centres participants au cours de la période de l'étude

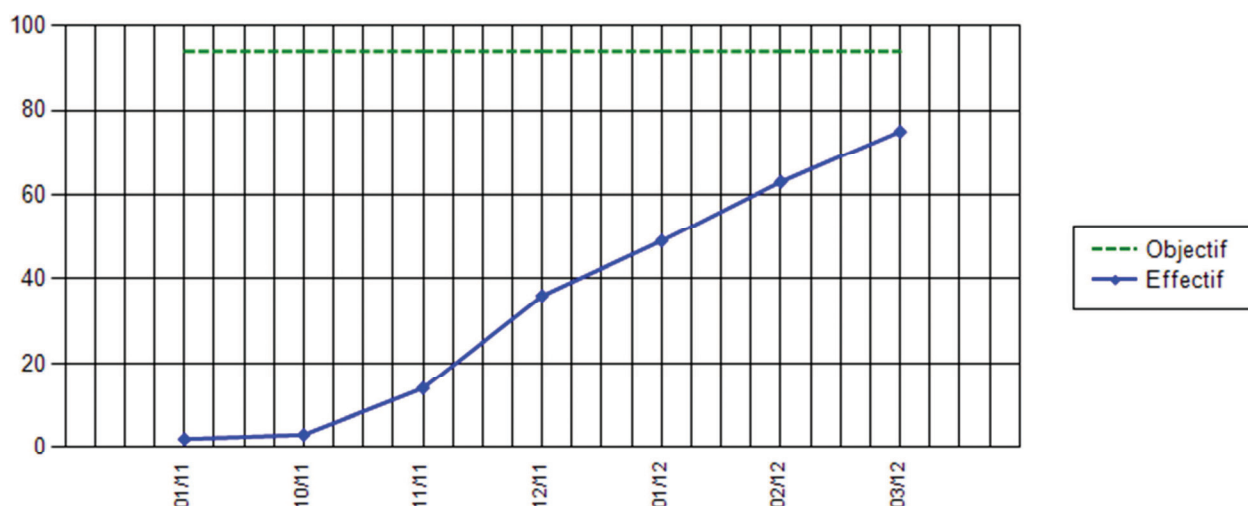


Figure 13 - Evolution de l'ouverture des centres de l'étude IFCT 1002

J. Amendement « Petit fumeur »

Un amendement a été déposé par le comité directeur pour étendre l'inclusion aux petits-fumeurs définis comme un individu ayant fumé moins de 5PA et sevré depuis plus de 15ans (55). Ces petits fumeurs étaient soumis aux mêmes questionnaires que les non-fumeurs (médecin et patient) et bénéficiaient du même prélèvement sanguin. Ils n'ont toutefois pas été intégrés dans la même base de données et les résultats de ce travail n'incluent donc que les analyses effectuées sur les non-fumeurs stricts (< 100 cigarettes dans la vie ; petits-fumeurs exclus).

K. Considérations statistiques

Les variables catégorielles étaient exprimées par leur pourcentage, accompagnées de leur intervalle de confiance à 95% (selon Wilson, avec correction de continuité) lorsque cela était pertinent. La comparaison de proportions utilisait le test du chi-carré si les effectifs attendus dans chaque groupe étaient supérieurs à 5 ; sinon, le test exact de Fisher était utilisé mais uniquement pour un tableau 2x2. Concernant les variables quantitatives, leur distribution normale était préalablement testée par le test de Kolmogorov-Smirnov. Les variables normales étaient exprimées par leur moyenne et leur écart-type et comparés par test de Student. Les variables dont la distribution n'était pas normales étaient exprimées par leur médiane et intervalle inter-quartile. Les comparaisons de ces dernières utilisaient le test U de Mann-Whitney U ou le test Kruskal-Wallis comme approprié. Certaines variables continues ont été catégorisées sur la base de la division en tertile ou quartile ou bien sur la base de catégories cliniquement pertinentes.

L'analyse multi variée a été réalisée à l'aide d'un modèle de Cox (méthode entrée). Les différentes variables étaient d'abord testées de manière uni-variée dans le modèle. Ensuite, les variables cliniquement pertinentes ou significatives en analyse uni-variée ont été rentrées dans le modèle multi-variée. De manière générale, les variables continues étaient privilégiées aux variables catégorielles dans ce modèle.

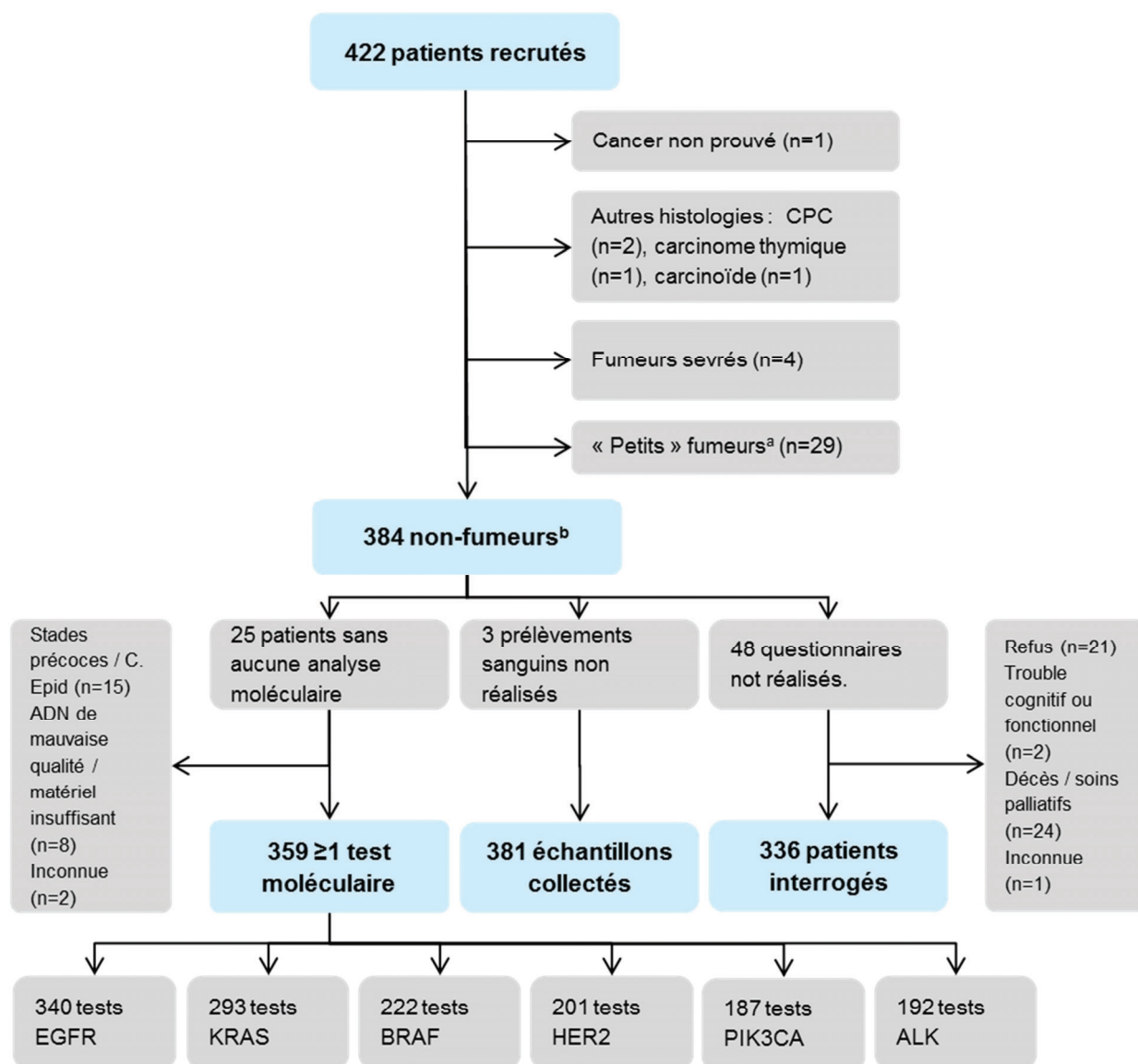
Des corrélations entre variables ont été recherchées à l'aide des méthodes de Pearson et Spearman comme approprié.

Toutes les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS v20 (IBM, Armonk, NY, EU). Tous les tests sont bilatéraux. Les valeurs manquantes sont reportées telles quelles. Un seuil de 0,05 a été choisi comme seuil de significativité pour les valeurs du p.

VIII. EPIDEMIOLOGIE CLINIQUE ET MOLECULAIRE DU CANCER BRONCHO-PULMONAIRE DES NON-FUMEURS EN FRANCE

A. Population de l'étude

Au total, 422 patients ont été recrutés dans BioCAST mais seuls 384 ont été retenus pour l'analyse. Trois cent trente-six ont pu remplir complètement le questionnaire patient, tous les questionnaires médecins ont été récupérés (n=384), 381 patients ont bénéficié d'un prélèvement sanguin (Figure 14). Enfin, 359 patients ont bénéficié d'au moins un test moléculaire (340 tests EGFR, 293 KRAS, 222 BRAF, 201 HER2, 187 PIK3, et 192 ALK).



a: Fumeur sévère depuis au moins 15 ans et ayant fumé moins de 5 paquets-années dans sa vie.
b: Moins de 100 cigarettes fumées au cours de la vie.

Figure 14 - Flow chart général de l'étude BioCAST

Les principales caractéristiques de la population incluse sont présentées dans le **Tableau 5** ainsi que dans les résultats de l'article connexe page 94 ainsi que de son supplément. Afin de mettre en perspective ces résultats, les résultats de l'étude épidémiologique KPB-CPHG 2010 menée dans le même temps et dans un certain nombre de centres communs que BioCAST sont fournis pour certaines variables. Ces résultats concernent uniquement les données observées parmi les patients fumeurs et atteints de cancer bronchique (n=6246) (5,56).

Tableau 5 - Principales caractéristiques de la population étudiée dans BioCAST

		Hommes		Femmes		p	Tous		Fumeurs / KBP-2010 (n=6246)
		n	%	n	%		n	%	
Sexe	Femmes	-		319			319	83%	19%
	Hommes	65		-			65	17%	81%
Age au diagnostic	Moy ± ET	66.6 ± 13.0		70.5 ± 11.7		*	69.8 ± 12.0		
	<55 ans	12	19%	30	9%	*	42	11%	
	>80 ans	10	15%	66	21%	NS	76	20%	9%
Origine géographique	Europe	51	88%	253	91%	NS	304	91%	
	Afrique	4	7%	12	4%		16	5%	
	Asie	1	2%	9	3%		10	3%	
	Caraïbes	2	3%	4	1%		6	2%	
	Manquant	7		41			48		
Stade	Stade I						35	9%	17%
	Stade II						22	6%	
	Stade III						45	12%	25%
	Stade IV						278	73%	59%
	Manquant						4		
Type histologique	Adénocarcinome						327	85%	51%
	<i>Dont invasif</i>						233	71%	
	<i>Dont lépidique</i>						16	7%	
	Carcinome épidermoïde						29	8%	33%
	C. à grandes cellules						17	4%	13%
	<i>Dont neuroendocrine</i>						10	59%	
	C. Adénosquameux						5	1%	2%
	C. Sarcomatoïde						4	1%	2%
	Carcinome SP						2	1%	

Au-delà des résultats attendus (prédominance de femme et d'adénocarcinomes (Figure 15)), on observe deux éléments originaux. En premier lieu, l'âge au diagnostic est plus élevé chez les non-fumeurs que chez les fumeurs (âge médian à 64ans dans KBP2010 contre 71ans dans BioCAST). La proportion de sujet de plus de 80ans est de 20% dans BioCAST contre 9% dans KBP-2010 (56). Cette différence semble être essentiellement liée aux femmes puisque l'âge au diagnostic des hommes non-fumeurs dans BioCAST est proche de celui des fumeurs, et significativement plus bas que celui des femmes non-fumeuses. En second lieu, les CBNF paraissent se présenter à un stade plus avancé que ceux des fumeurs dans KBP-2010 (73% de stade 4 vs 59% respectivement) (Figure 16).

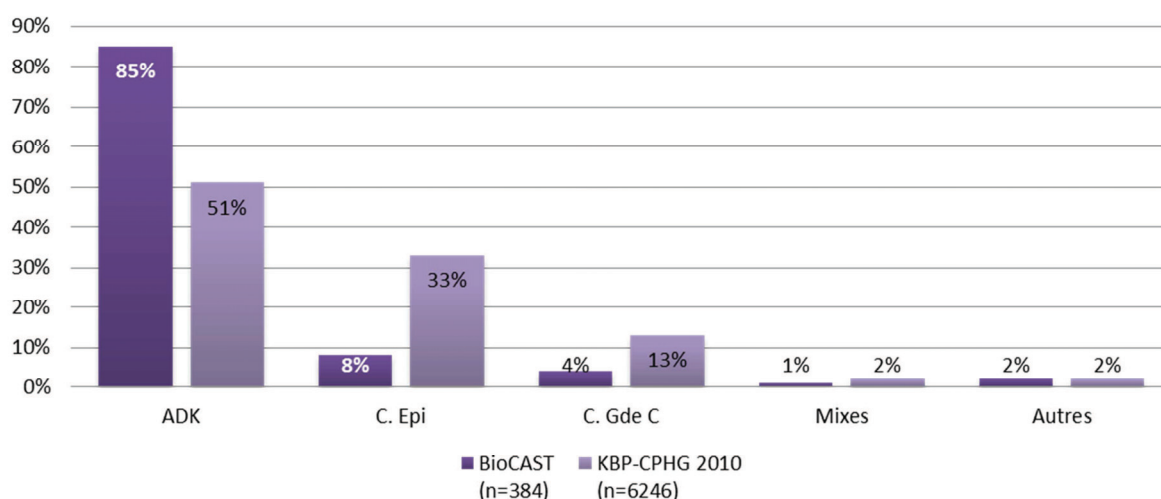


Figure 15 - Profil histologique comparé des non-fumeurs de BioCAST et des fumeurs de KBP 2010

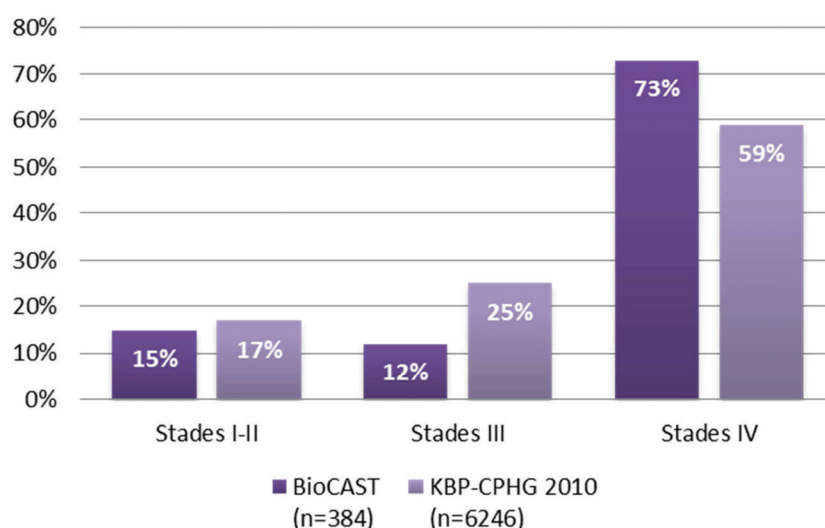


Figure 16 - Profil comparé du stade au diagnostic chez les non-fumeurs de BioCAST et les fumeurs de KBP 2010

B. Exposition aux facteurs de risque

L'exposition aux différents facteurs de risque est également rapportée et détaillée dans l'article connexe figurant page 94.

Globalement, 66% de la population de la cohorte a été exposée de manière significative au tabagisme passif (vie commune sous le même toit ou travail dans la même pièce qu'un ou plusieurs fumeurs pendant au moins un an). Cette exposition est significativement différente entre homme et femme puisqu'elle est nettement plus fréquente chez les femmes. Cette différence est essentiellement liée à l'exposition domestique puisque l'on n'observe aucune différence selon le genre pour l'exposition au travail (environ 20%) (Figure 17). On notera également que les femmes sont significativement exposées de manière plus durable (en nombre d'année d'exposition cumulée) que les hommes dans leur intoxication domestique (Figure 18).

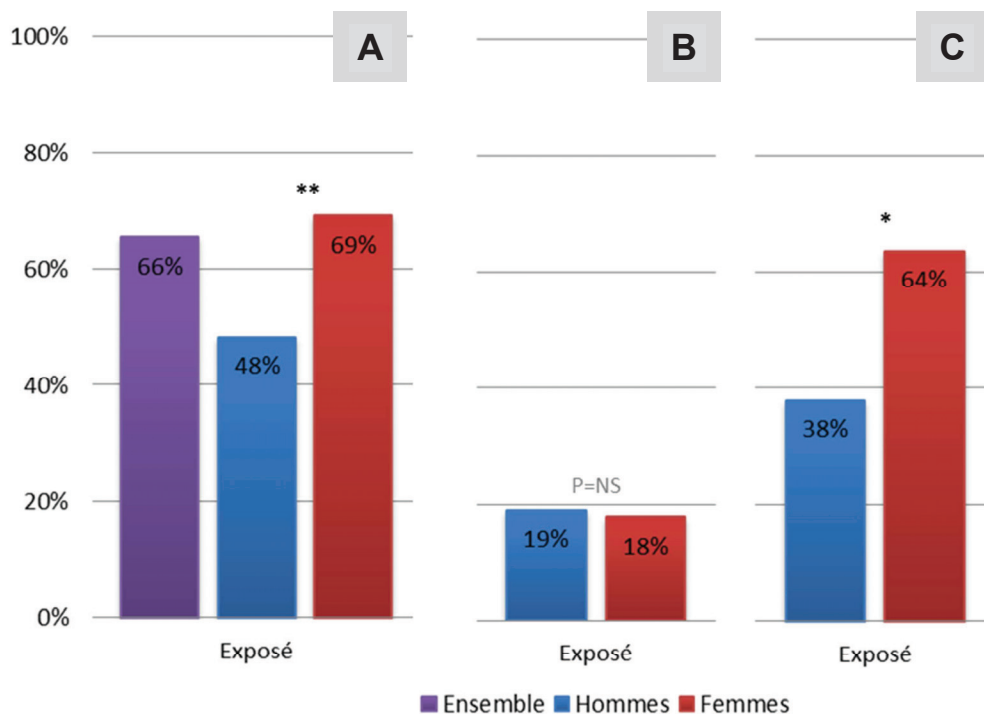


Figure 17 - Exposition au tabagisme passif selon le genre, de manière globale (A), au travail (B) et de manière domestique (C). *p < 10-4; **p<0,01

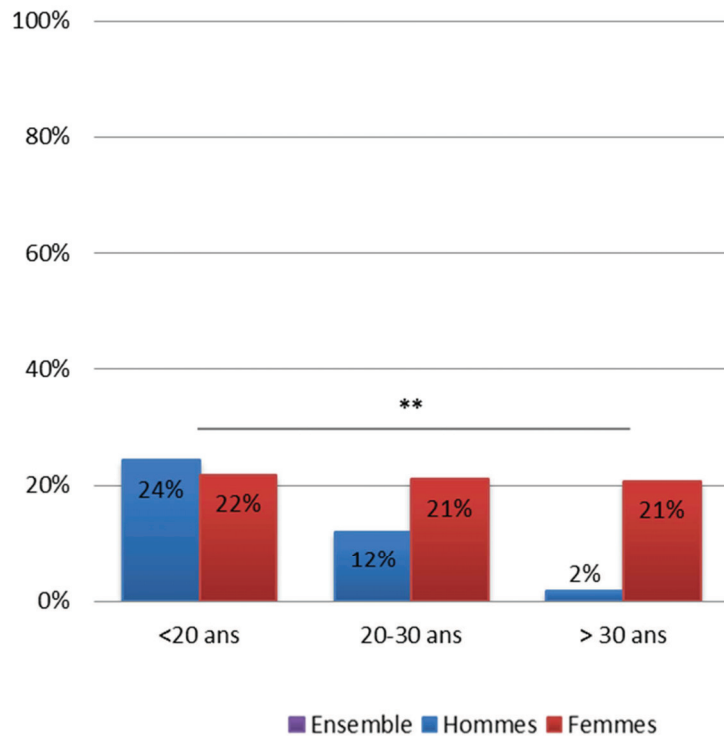


Figure 18 - Durée d'exposition cumulée au tabagisme passif selon le genre et divisée en trois catégories.

**p<0,01

L'exposition aux différents carcinogènes professionnels retrouvés dans la cohorte est présentée dans la Figure 19. On observe d'emblée une différence significative dans la fréquence d'exposition entre hommes et femmes. En effet, 35% des hommes de la série présentent une exposition certaine à au moins un cancérigène contre 8% des femmes. Cette différence se maintient quelle que soit l'agent considéré.

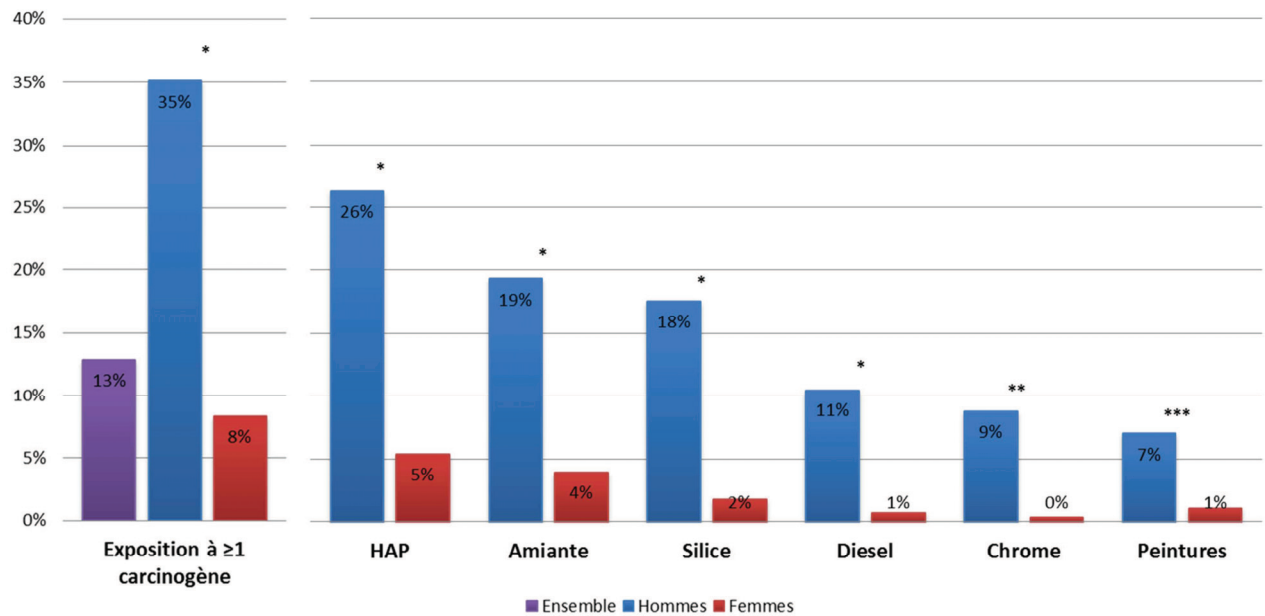


Figure 19 - Exposition certaines aux différents carcinogènes professionnels en fonction du genre. HAP – Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques. *p < 10⁻⁴; **p<0,001; ***p<0,05

L'exposition aux polluants domestiques est rapportée dans la figure. Elle est exprimée en utilisant les indicateurs et définitions précédemment rapportées dans la littérature (45,46). L'exposition aux huiles de cuisson est significativement plus fréquente chez les femmes que chez les hommes. Par contre, l'exposition aux fumées de combustibles solides utilisés pour le chauffage ou la cuisine est similaire dans les deux sexes (Figure 20).

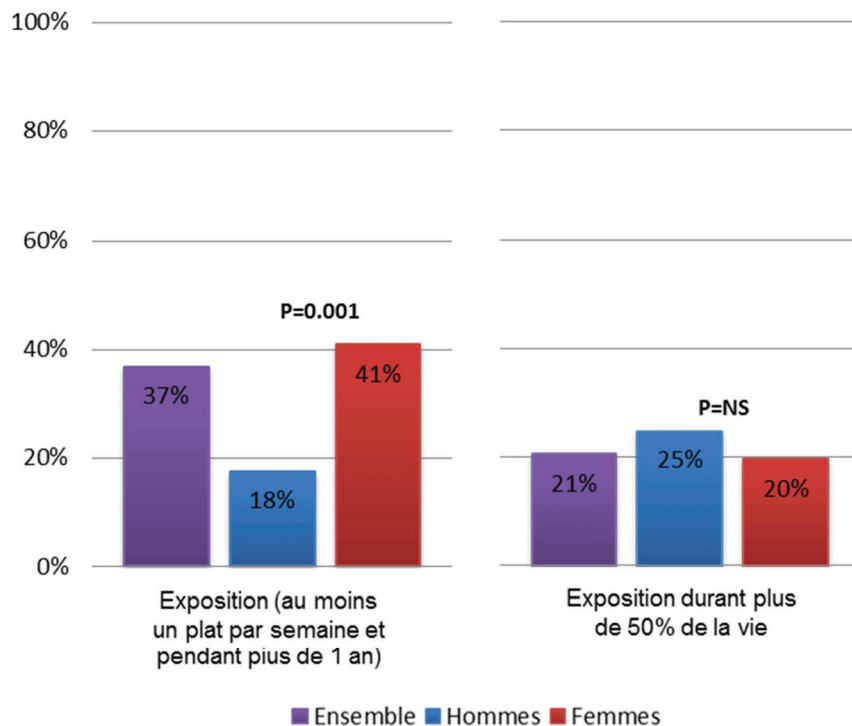


Figure 20 - Exposition aux polluants domestiques (huile de cuisson à droite, fumées de chauffage et cuisine à gauche) selon le genre

L'exposition aux facteurs liés aux antécédents personnels et familiaux est présentée dans la Figure 21. On notera la fréquence importante de patient disposant d'au moins deux antécédents familiaux de cancer broncho-pulmonaire (apparentés biologique au 1^{er} degré) tout en soulignant qu'il existe un facteur confondant avec l'exposition au tabagisme passif. Près d'un tiers de l'ensemble de la cohorte a également au moins un antécédent personnel d'infection respiratoire. On ne retrouvait aucune différence selon le genre.

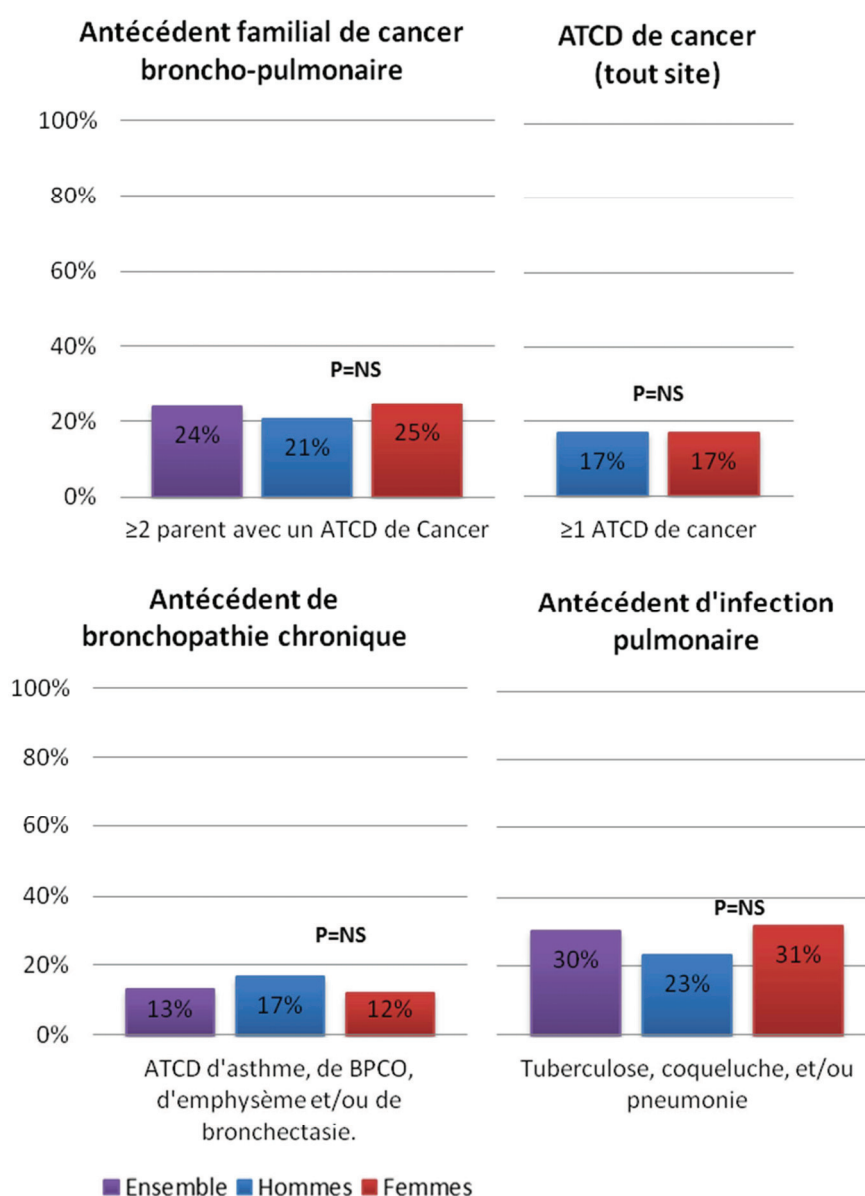


Figure 21 - Fréquence d'exposition aux antécédents familiaux de cancers broncho-pulmonaire (Haut-droite), aux antécédent personnel de cancer de tous site (Haut-gauche), aux antécédents personnels de bronchopathie chronique (asthme, BPCO, emphysème; Bas-droite) et aux antécédents personnels d'infections pulmonaires (tuberculose, pneumonie, coqueluche ; bas-gauche)

C. Profil moléculaire

Sur les 384 patients analysés, 339 ont donc bénéficié de au moins un test moléculaire (par ordre de fréquence : EGFR, KRAS, BRAF, HER2, ALK et PIK3). Enfin, 285 patients ont soit au moins un test retrouvant une anomalie soit au moins un test EGFR et KRAS et ALK négative. Au total, nous avons retrouvé 153 mutations EGFR chez 147 patients, 24 réarrangements dans le gène ALK, 20 mutations de KRAS, 10 mutations dans BRAF, 8 mutations dans HER2 et 5 mutations dans PI3K chez 4 patients. Les

cas de mutation multiple étaient rares (11 cas dont 5 cas dans lesquelles les mutations étaient toutes dans le gène EGFR).

Aucune différence n'a été mise en évidence dans le type et la fréquence des mutations en fonction du genre (Figure 22).

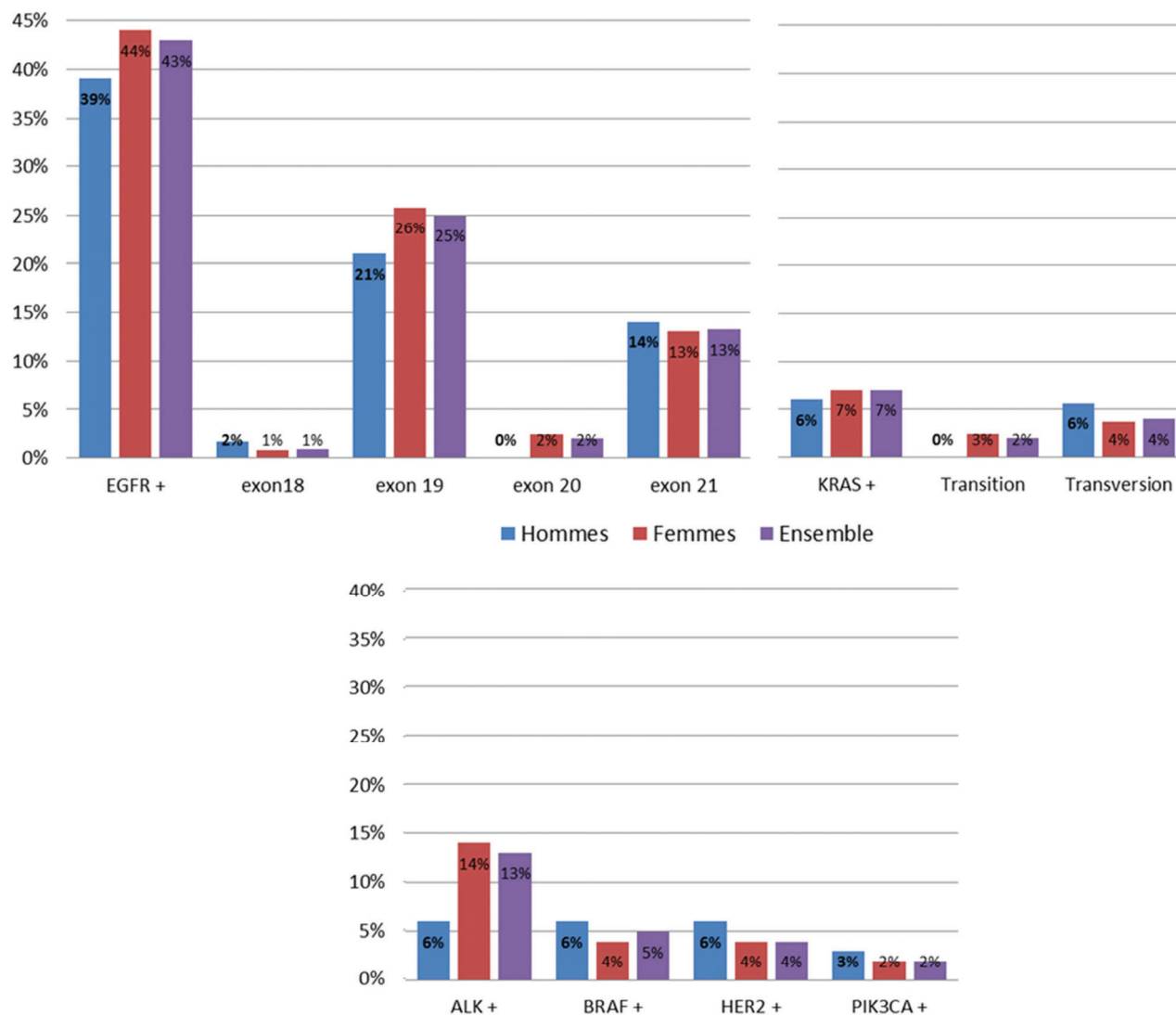


Figure 22 - Fréquence et type de mutation observée en fonction du genre (n=339)

Au total, 72% des patients de BioCAST présentaient une anomalie moléculaire identifiable. Dans la grande majorité des cas il s'agissait d'une mutation sur EGFR (51% des patients de la série). Ces chiffres peuvent être mis en perspectives avec d'autres séries. Par exemple, l'étude de l'INCa promue par l'IFCT, biomarqueurs France, portant sur près de 10000 patients, montre un profil tout à fait différents sur les 7789 fumeurs qu'elle comporte (). On observe en effet que les non-fumeurs présentent plus fréquemment des mutations de l'EGFR (51% dans BioCAST contre 5% dans BM France), des réarrangements ALK (8% vs 4% respectivement) ou encore de HER2 (3% vs <1%). Inversement, les mutations de KRAS sont

très nettement plus fréquentes chez les fumeurs comparés aux non-fumeurs (32% vs 6%) tout comme celles de PIK3 (2% vs <1%). Par contre, on note une fréquence des mutations BRAF similaires entre les deux séries (14) ().

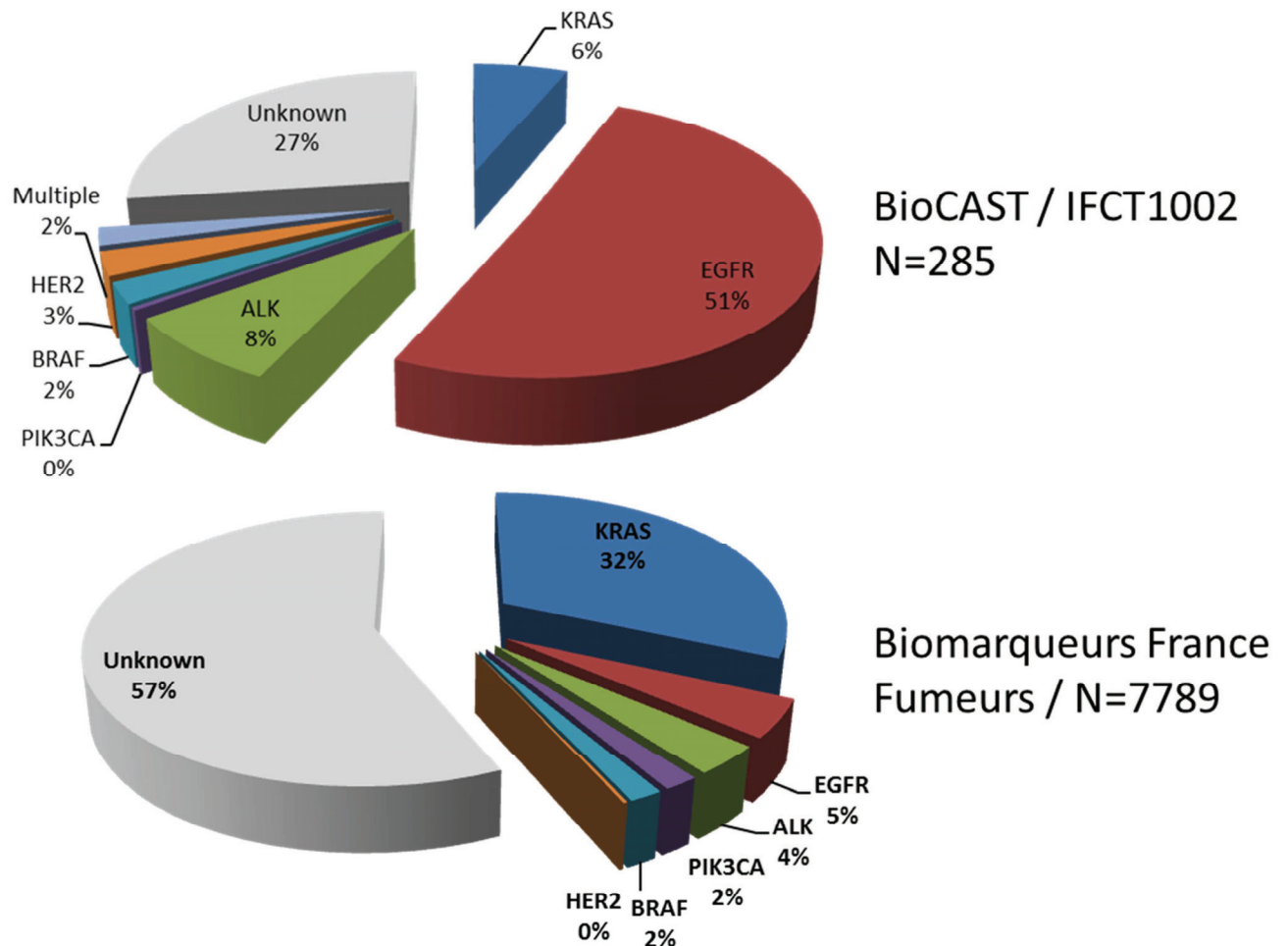


Figure 23 - Répartition des mutations somatiques chez les non-fumeurs de BioCAST (n=285, en haut) et les fumeurs de biomarqueurs France (n=7789, en bas)

La comparaison avec des séries de non-fumeurs en Amérique du Nord ou en Asie démontre les différences profondes qui existent en fonction de l'origine géographique des patients (**Figure 24**).

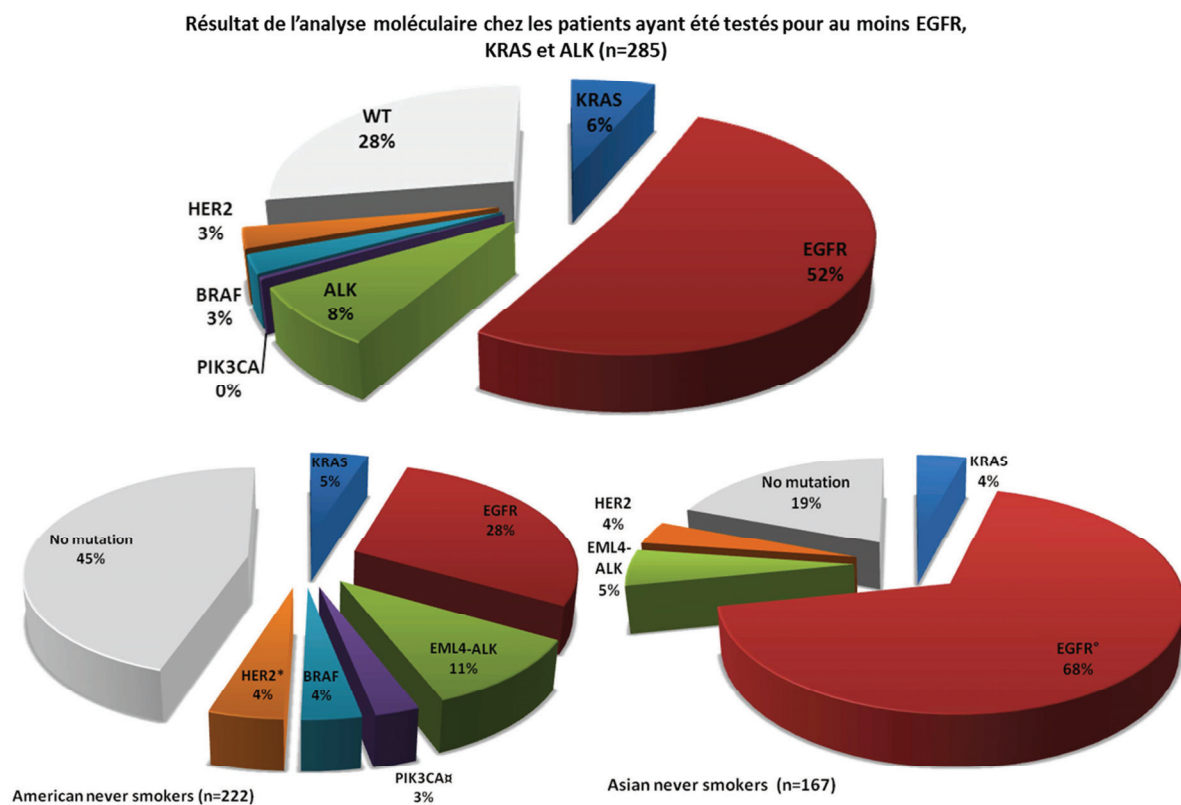


Figure 24 - Comparaison du profil somatique chez des non-fumeurs Français, américains et asiatiques (d'après référence (2)).

D. ARTICLE – RESULTATS de l'étude BioCAST : analyse descriptive épidémiologique et moléculaire de la cohorte (Sous presse, *European Respiratory Journal*).

Couraud S, Souquet P-J, Paris C, Dô P, Doubre H, Pichon E, Dixmier A, Monnet I, Etienne-Mastroianni B, Vincent M, Trédaniel J, Perrichon M, Foucher P, Coudert B, Moro-Sibilot D, Dansin E, Labonne S, Missy P, Morin F, Blanché H, and Zalcman G on behalf of The French Cooperative Intergroup IFCT. BioCAST / IFCT-1002: Epidemiologic and Molecular Features of Lung Cancer in Never-Smoker. *Eur Respir J*. 2014: [in press].

Communications orales associées

Couraud S, Souquet P-J, Paris C, Gervais R, Doubre H, Pichon E, Dixmier A, Monnet I, Etienne-Mastroianni B, Vincent M, Tredaniel J, Perrichon M, Foucher P, Coudert B, Moro-Sibilot D, Dansin E, Labonne S, Missy P, Zalcman G. The BioCAST / IFCT-1002 Study: A Comprehensive Overview Of Demographic, Risk Exposure And Somatic Mutations Of Non-Small Cell Lung Cancer Occurring Among French Never Smokers. #O18.03. 15th World Conference on Lung cancer, Sydney, October 2013. *J Thorac Oncol*. 2013;8(Supp 2): S2-S1410

Couraud S. Cancer broncho-pulmonaires chez les non-fumeurs. 18ème congrès de Pneumologie de langue Française (2014). Session Plénière A09. *Rev Mal Respir*. 2014; 31(7): Supp 1



BioCAST/IFCT-1002: epidemiological and molecular features of lung cancer in never-smokers

Sébastien Couraud^{1,2,3,4}, Pierre-Jean Souquet^{1,2}, Christophe Paris⁵, Pascal Dô⁶,
Hélène Doubre⁷, Eric Pichon^{8,9}, Adrien Dixmier¹⁰, Isabelle Monnet¹¹,
Bénédicte Etienne-Mastroianni^{12,13}, Michel Vincent¹⁴, Jean Trédaniel¹⁵,
Marielle Perrichon¹⁶, Pascal Foucher¹⁷, Bruno Coudert¹⁸,
Denis Moro-Sibilot^{19,20}, Eric Dansin²¹, Stéphanie Labonne^{1,2}, Pascale Missy²²,
Franck Morin²², Hélène Blanché²³ and Gérard Zalcman²⁴, on behalf of The
French Cooperative Intergroup IFCT²⁵

Q1

Affiliations: ¹Department of Respiratory Medicine, Lyon Sud Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. ²Faculty of Medicine Lyon-Sud Charles Mérieux, Lyon 1 University, Lyon, France. ³Centre for Clinical Epidemiology, Lady Davis Institute for Medical Research, Jewish General Hospital, Montreal, Quebec, Canada. ⁴Department of Epidemiology, Biostatistics and Occupational Health, McGill University, Montreal, Quebec, Canada. ⁵[CP] INGRES, EA7298, Lorraine University, Vandoeuvre Les Nancy, France. ⁶Francois Baclesse Cancer Institute, Caen, France. ⁷Pulmonology Unit, Foch General Hospital, Paris, France. ⁸Pulmonology Unit, University Hospital of Tours, Tours, France. ⁹François Rabelais University, Respiratory Diseases Study Centre, U1100/EA6305, Tours, France. ¹⁰Pulmonology Unit, Orleans Regional Hospital, Orléans, France. ¹¹Pulmonology Unit, Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Créteil, France. ¹²Department of Respiratory Medicine, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. ¹³Claude Bernard University Lyon 1, Lyon, France. ¹⁴Pulmonology Department, Saint Joseph-Saint Luc Hospital, Lyon, France. ¹⁵Pulmonology Department, Paris - Saint Joseph Hospital, and Sorbonne Paris Cité University, Paris, France. ¹⁶Pulmonology Department, Bourg-en-Bresse General Hospital, Bourg en Bresse, France. ¹⁷Thoracic Oncology, Dijon University Hospital, Dijon, France. ¹⁸Oncology department, Georges François Leclerc Cancer Centre, Dijon, France. ¹⁹Pulmonology and Thoracic Oncology Department, Grenoble University Hospital, Grenoble, France. ²⁰Medicine Faculty, Joseph Fourier University, La Tronche, France. ²¹Oncology Department, Oscar Lambret Cancer Centre, Lille, France. ²²Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique, Paris, France. ²³Fondation Jean Dausset - CEPH, Paris, France. ²⁴Pulmonology and Thoracic Oncology Department, Caen University Hospital, and UMR INSERM 1086, Caen Basse-Normandie University, Caen, France. ²⁵For collaborators of the BioCAST/IFCT-1002 study, please see the acknowledgements section.

Q2

Q3

Correspondence: Sébastien Couraud, Service de Pneumologie, Hospices Civils de Lyon, CH Lyon Sud, 165 Chemin du Grand Revoyet, F-69495 Pierre Bénite, France. E-mail: sebastien.couraud@chu-lyon.fr

ABSTRACT Lung cancer in never-smokers (LCINS) (fewer than 100 cigarettes in lifetime) is considered as a distinct entity and harbours an original molecular profile. However, the epidemiological and molecular features of LCINS in Europe remain poorly understood.

All consecutive newly diagnosed LCINS patients were included in this prospective observational study by 75 participating centres during a 14-month period. Each patient completed a detailed questionnaire about risk factor exposure. Biomarker and pathological analyses were also collected. We report the main descriptive overall results with a focus on sex differences.

384 patients were included: 65 men and 319 women. 66% had been exposed to passive smoking (significantly higher among women). Definite exposure to main occupational carcinogens was significantly higher in men (35% *versus* 8% in women). A targetable molecular alteration was found in 73% of patients (without any significant sex difference): *EGFR* in 51%, *ALK* in 8%, *KRAS* in 6%, *HER2* in 3%, *BRAF* in 3%, *PI3KCA* in less than 1%, and multiple in 2%.

We present the largest and most comprehensive LCINS analysis in a European population. Physicians should track occupational exposure in men (35%), and a somatic molecular alteration in both sexes (73%).



@ERSpublications

Occupational exposure and targetable mutation should be tracked in lung cancer of European never-smokers. <http://ow.ly/FB2WS>

Introduction

Although tobacco smoking is the strongest causal factor for lung cancer, 10–25% of lung cancer worldwide occurs in lifelong nonsmokers (300 000 deaths each year) [1–3]. A “never-smoker” is well-defined as an individual who has smoked fewer than 100 cigarettes during their lifetime. Lung cancer occurring in never-smokers (LCINS) is now considered a distinct entity. However, this disease appears strongly linked to geographical origins. For example, LCINS is drastically more common in Asia than in the USA or Europe [2]. This could be related to distinct features pertaining to inherited susceptibility, as well as to varied exposure to occupational and environmental carcinogens in different geographical areas. Thus, it is possible that LCINS is, in fact, globally a very heterogeneous disease [1, 2]. Although the disease is thought to be well characterised, very little data on LCINS are available in Europe [4], and nobody has concomitantly assessed most of the known risk factors for lung cancer.

LCINS is also known to hold an original spectrum of driver mutations. Thus, human epidermal growth factor receptor family (*EGFR* (also called *HER1*) and *HER2*) mutations appear more frequent, while *KRAS* (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue) and *BRAF* (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1), thought to be related to tobacco carcinogens, are less common in this group [5–7]. Finally, *ALK* (anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase) rearrangements also occur slightly more frequently in never-smoking patients [8]. This spectrum is another argument favouring the hypothesis that separate genetic pathways lead to lung carcinogenesis in ever- and never-smokers [1].

Given that the clinical and molecular epidemiology of LCINS in Europe is still poorly understood, the French Collaborative Intergroup for Thoracic Cancer Research (IFCT) sought to investigate this specific entity through a prospective cohort of LCINS. The BioCAST(IFCT-1002) study’s main objective was to describe a French population of LCINS patients and especially the distribution of risk factor exposure and biomarker patterns. Here we report this study’s main descriptive results, focusing on potential sex differences among LCINS patients.

Population and methods

Population

Main inclusion criteria were: 1) being a self-declared never-smoker (*i.e.*, declaring having smoked fewer than 100 cigarettes during lifetime); 2) being newly diagnosed with a non-small cell lung cancer (NSCLC) by biopsy or by cytological sampling; 3) being aged at least 18 years; 4) speaking and understanding French (or having access to a relative able to translate); 5) having phone access, either at home or at the hospital; and 6) granting signed consent.

The IFCT sponsored the BioCAST study. The study was conducted in 75 participating centres throughout metropolitan France, from November 1, 2011 to January 31, 2013. Participating centres were asked to include all consecutive newly diagnosed LCINS cases. IFCT research staff members were in charge of administrative management and quality assurance (in compliance with international research standards) [9].

Ethics

The Sud-Est IV Lyon ethics committee approved the study protocol on September 13, 2011. The Advisory Committee on Information Processing for Health Research permitted use of a computerised database on September 8, 2011, and the National Commission for Data Protection was contacted on September 23, 2011, in accordance with French law. Blood sample collection was declared to the French Ministry of Research on July 1, 2011. The BioCAST study was registered on the US National Institute of Health website www.clinicaltrials.gov under the CTC ID NCT01465854.

Study design

Patients signed their consent after receiving information about the study from their physicians. Afterward, and before any anti-cancer treatment, each patient’s blood was sampled. Patients were then contacted by phone in order to schedule a dedicated phone interview and complete a standardised questionnaire. All

This article has supplementary material available from erj.ersjournals.com.

Received: March 5 2014 | Accepted after revision: Nov 23 2014

Support statement: The BioCAST/IFCT-1002 study was supported by research grants from Astra-Zeneca, Boehringer Ingelheim, Lilly, Pfizer, Pierre-Fabre and Roche. The funding sources had no role in the design, analysis and interpretation of the results, and thus the authors were independent from the funding source.

Conflict of interest: Disclosures can be found alongside the online version of this article at erj.ersjournals.com

Copyright ©ERS 2015

patients had the opportunity to fully prepare this questionnaire before the pre-planned interview. Patients were also encouraged to seek assistance from a relative if needed (in cases of fatigue, deafness, memory deficiency or poor spoken French). Two trained research assistants performed all the interviews in order to control for reporting and interrogation biases. Additional medical data, as well as molecular testing and pathological reports were collected directly from participating physicians.

Patients' questionnaire

A 17-page questionnaire was delivered to patients upon inclusion. It included questions about demographics, socio-educative level and alternative tobacco consumption, as well as cannabis smoking, passive smoking exposure, occupational exposure, personal medical history, family history, alcohol intake and fried and stir-fried cooking exposure. Occupational exposures to bronchial carcinogens were assessed using a lifelong task-based questionnaire which performances were recently published [10]. All patients were questioned about their home addresses and exposure to solid fuel for cooking or heating. Finally, women declared oral contraceptive and post-menopausal hormone replacement therapy intake, as well as other details on reproductive factors. Additional detailed information on recorded data and exposure measurements are provided in supplemental file S1.

Q6

Biomarker analyses

The French National Cancer Institute (INCa) launched a network of 28 molecular genetics platforms that provide routine cancer molecular testing for all patients [11]. Each BioCAST participant centre was asked to systematically order tests for somatic mutations in *EGFR* and *KRAS*, as well as *ALK* fusion gene, to its local labelled platform. Investigator sites were also encouraged to request *BRAF*, *HER2*, and *PI3KCA* mutation analyses, which are also routinely performed (free of charge to the patient) at these platforms. All centers were advised to follow local policy, and were therefore allowed to forego further mutation testing if one mutation reputed to exclude the others was found. Final and detailed reports of these analyses were collected for each patient.

Q7

Actually, biomarker testing methods are not homogeneous throughout all centers. However, the ERMETIC study was designed to assess concordance of results between each centers (blinded cross validation study compared to an international reference lab) and between the different methods used in such centers (direct sequencing, PCR-based, Restriction fragment-length polymorphism, and high-resolution melting). This validation study showed good concordance rate suggesting that – despite some difference in sample processing and analyses – results are accurate [12, 13].

Blood samples bio-bank

Four tubes of each patient's blood were collected for further studies (two stored in EDTA, one dry and one ACD-citrated). Samples were transported to the BioCAST central laboratory (hosted at the Centre d'Étude du Polymorphisme Humain, Fondation Jean Dausset, Paris, France) at room temperature within 24 h of sampling and were then processed.

Statistics

Categorical variables were expressed as percentages. Comparisons of proportions used the Chi-squared test when the expected count in a given category was at least five, or Fisher's exact test otherwise. We used the one-sample Kolmogorov–Smirnov test in order to assess the plausibility of a normal distribution assumption for continuous variables. Normally distributed continuous variables were expressed as mean and standard deviation. Comparisons of means were conducted using the bilateral t-test. Differences in distribution of continuous variables between two independent samples were assessed using the Mann–Whitney U-test, and the Kruskal–Wallis one-way ANOVA was used to compare more than two independent samples. Some continuous variables were also categorised in quartiles, tertiles or clinically relevant categories according to their distribution in the overall population. Missing values were reported as such, and all tests were two-sided. All statistics were calculated using the SPSSv20 (IBM SPSS Statistics, New York, NY, USA).

Results

Population

Altogether, 384 consecutive French never-smokers were included during the study period. Of these, 336 (87.5%) completed the interview, 359 (93%) had at least one biomarker testing, and 381 (99.2%) underwent the correct blood sampling procedure (fig. 1).

Main demographic data

Table 1 gives the overall population's main features and a sex comparison. The sex ratio was 4.9 in favour of women. There was no patient-reported alternative smoking (water-pipe, cigar, pipe or gum) or cannabis use. 91% of patients originated from Europe: 276 from Western Europe, 22 from Southern Europe and six

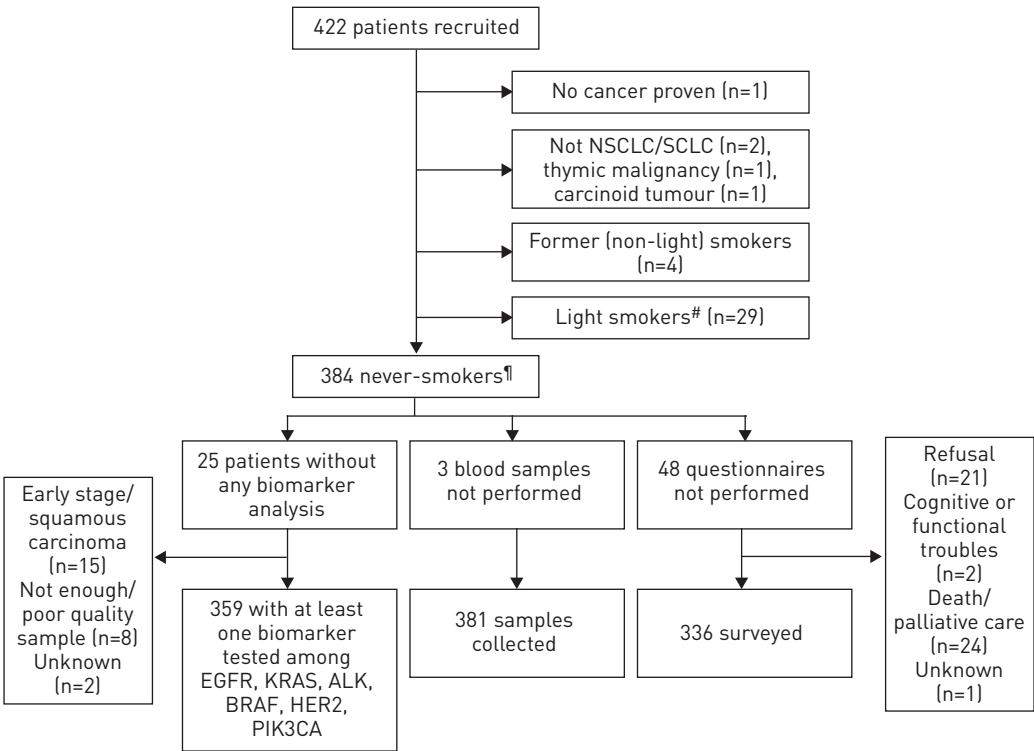


FIGURE 1 Flow chart of the BioCAST study. NSCLC: Non-small cell lung cancer; SCLC: Small cell lung cancer; a) Smoked fewer than five packs/year in lifetime and quit at least 15 years prior; b) Smoked fewer than 100 cigarettes in lifetime.

from Eastern Europe. Men were, on average, 4 years younger than women ($p=0.016$), and the proportion of patients aged <55 years old at diagnosis was significantly higher among males. In addition, men were better educated, more pre-obese and exhibited higher alcohol consumption than women.

Histology and stage of the disease

The main pathological lung cancer features found in our 384 patients are shown in table S2 in the online supplementary material. We found no significant difference between the sexes. Notably, the frequency of squamous cell carcinoma (SCC) was similar in both sexes (9% in women *versus* 7% in men; $p=0.606$). Most cases were adenocarcinoma (85%). The other histological types were SCC (8%), large cell carcinoma (4%), adenosquamous ($n=5$), sarcomatoid carcinoma ($n=4$) and carcinoma not otherwise specified ($n=2$). thyroid transcription factor 1 immunostaining was positive in 76% of patients. Table S3 in the online supplementary material shows sample type and origin. Most were core biopsies (90%) from primitive tumours (69%) and were classified as stage IV (73%).

Occupational exposure

Data about exposure to occupational carcinogens was available in 334 patients, and results are presented in table 2. Altogether, 13% of patients were found to have been definitely exposed to at least one occupational carcinogen, with a striking difference between the sexes: 35% of men compared with only 8% of women ($p<10^{-4}$). The most frequent carcinogenic agent was polycyclic aromatic hydrocarbons, followed by asbestos, silica and diesel exhaust. Whatever the agent considered, men were in all cases significantly more exposed than women.

Passive smoke exposure

Overall, 219 (66%) of the 334 patients were ever exposed to passive smoking, either in a domestic setting (59%) or in the workplace (18%) (table 3). Domestic exposure to passive smoking was significantly more common among women than men (64 *versus* 38%; $p=0.0001$), but this sex difference was not observed for workplace exposure. Moreover, of those exposed in a domestic setting, women were exposed for a significantly longer period than men. For patients exposed in a domestic setting, exposure began during childhood in 62% of patients. Men were more frequently exposed in childhood than women, suggesting that women were mainly exposed *via* their spouses.

Q8

TABLE 1 Main characteristics of the BioCAST population

	Lung cancer in never smokers (BioCAST)			Lung cancer in ever smokers [#]
	Men	Women	p value	
Total patients n				384
Sex				6246
Women		319 [83]		19%
Men	65 [17]			81%
Age	66.6±13.0	70.5±11.7	0.016 [¶]	69.8±12.0
<55 years old	12 [19]	30 [9]	0.033	42 [11]
World region origin				
Missing data n	7	41		48
Europe	51/58 [88]	253/278 [91]	0.468 [§]	304/336 [91]
Africa	4/58 [7]	12/278 [4]		16/336 [5]
Asia	1/58 [2]	9/278 [3]		10/336 [3]
Caribbean	2/58 [3]	4/278 [1]		6/336 [2]
Education level				
Missing data n	7	44		51
High school and more	34/58 [59]	115/275 [42]	0.037	149/333 [45]
Secondary school	13/58 [22]	66/275 [24]		79/333 [24]
Never schooled/Primary school	11/58 [19]	94/275 [34]		105/333 [32]
Body mass index kg·m⁻²	25.4±4.8	23.7±5.4	0.015 ^f	24.2±5.5
Missing data n	7	46		53
Underweight/normal	27/58 [47]	165/273 [60]	0.087	192/331 [58]
Pre-obese	24/58 [41]	74/273 [27]		98/331 [30]
Obese	7/58 [12]	34/273 [13]		41/331 [12]
Alcohol intake (in standard glass per day)				
Missing data n	7	43		50
0–1	49/58 [85]	265/276 [96]	0.003 ^{##}	314/334 [94]
≥2	9/58 [16]	11/276 [4]		20/334 [6]

Data are presented as n (%), median±interquartile range or n/N available (%), unless otherwise stated. [#]: data from the KBP-CPHG study [14]; [¶]: t-test; ⁺: both smokers and never smokers (n=7051); not available for smokers only; [§]: computed between “European” and “non-European” categories; ^f: Mann-Whitney U test; ^{##}: Fisher’s exact test; all others are Chi-squared tests (for categorical variables).

Q14
Q15
Q16

Domestic pollution

Table S4 in the online supplementary material provides exposure to domestic pollution. Women more frequently reported having ever been exposed to cooking oil fumes (41 *versus* 18%; p=0.001). 26% of patients reported to have been exposed for >50% of their lifetimes to solid fuel fumes; here there was no significant difference between men and women.

Personal and familial medical history

24% of patients reported having at least two biological first-degree relatives with lung cancer, and 17% reported a personal history of at least one other cancer. Medical histories of pertussis, tuberculosis and

TABLE 2 Definite exposure to occupational carcinogens (by task) according to sex

	Men	Women	p value	All
Overall (at least one)	20 [35]	23 [8]	<10 ⁻⁴	43 [13]
PAH	15 [26]	15 [5]	<10 ⁻⁴	30 [9]
Asbestos	11 [19]	11 [4]	<10 ⁻⁴ [#]	22 [7]
Silica	10 [18]	5 [2]	<10 ⁻⁴ [#]	15 [4]
Diesel	6 [11]	2 [1]	<10 ⁻⁴ [#]	8 [2]
Chrome	5 [9]	1 [0]	0.001 [#]	6 [2]
Paint	4 [7]	3 [1]	0.018 [#]	7 [2]
Missing data	8	42		50

Data are presented as n (%), unless otherwise stated. PAH: polycyclic aromatic hydrocarbons. [#]: Fisher’s exact test, others are Chi-squared tests.

TABLE 3 Passive smoking exposure according to sex

	Domestic exposure				Workplace				Overall			
	Men	Women	p-value	All	Men	Women	p-value	All	Men	Women	p-value	All
Missing n	7	43		50	7	43		50	7	43		50
Never exposed	36/58 (62)	100/276 (36)	<10 ⁻⁴	136/334 (41)	47/58 (81)	227/276 (82)	0.827	274/334 (82)	30/58 (52)	85/276 (31)	0.002	115/334 (34)
Ever exposed	22/58 (38)	176/276 (64)		198/334 (59)	11/58 (19)	49/276 (18)		60/334 (18)	28/58 (48)	191/276 (69)		219/334 (66)
Missing data		4		4		1		1		3		3
Length of exposure												
<20 years [#]	14/22 (64)	59/172 (34)	0.008	73/194 (38)	8/11 (73)	23/48 (48)	NC	31/59 (53)	15/28 (54)	49/188 (26)	0.002	64/216 (30)
20–30 years [#]	7/22 (32)	57/172 (33)		64/194 (33)	2/11 (18)	15/48 (31)		17/59 (29)	11/28 (39)	70/188 (37)		81/216 (38)
>30 years [#]	1/22 (5)	56/172 (33)		57/194 (29)	1/11 (9)	10/48 (21)		11/59 (19)	2/28 (7)	69/188 (37)		71/216 (33)
Exposed in childhood [#]	18/22 (82)	104/172 (59)	0.039	122/194 (62)								
Exposed in adulthood only [#]	4/22 (8)	72/172 (41)		76/194 (38)								
Data are presented as n/N available (%), unless otherwise stated. NC: not computable; all p-values are computed with chi-squared tests.												

pneumonia were reported in 21%, 8% and 6% of patients, respectively. In addition, 13% had been diagnosed with a chronic bronchial disease. There were no differences between the sexes with respect to these variables (Table S5 in the online supplementary material).

Reproductive factors and hormone intake in women are reported in table S6 in the online supplementary material. Overall, 115 (42%) patients had used oral contraceptives, and 70 (25%) had undergone post-menopause hormonal replacement therapy.

Biomarkers (somatic mutations)

EGFR mutations were tested in 340 patients, KRAS in 293, ALK rearrangements in 192, BRAF in 22, HER2 in 201, and PI3KCA in 187. Altogether, we found 220 molecular alterations in 208 patients (table 4). Six patients carried a somatic mutation within two (n=5) or three (n=1) genes simultaneously (multiple mutations), while five others hosted two simultaneous somatic mutations in the *EGFR* gene (table S7 in the online supplementary material). Alterations in the *EGFR* gene were the most common: 147 patients displayed 153 mutations, with deletions in exon 19 and substitution L858R in exon 21 being the most frequent (n=74 and 33, respectively). We also found one missense mutation T790M in exon 20 and one alteration never reported before in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) database (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic>) (c.2303_2305delinsTCT in exon 20). In addition, 24 gene fusions involving the *ALK* gene were observed in 23 patients. We also noted 20 *KRAS* mutations in 18 patients, 10 *BRAF* mutations in nine patients, eight *HER2* mutations in eight patients, and five *PI3KCA* mutations in three patients. Overall, an *EGFR* mutation was found in 43% of individuals, a *KRAS* mutation in 7%, a *BRAF* mutation in 5%, a *HER2* mutation in 4%, a *PI3KCA* mutation in 2%, and an *ALK* rearrangement in 13% of patients tested for the corresponding biomarker. We found no significant difference in the mutation frequency as well as in the mutation type according to the gender. For EGFR, women exhibit a higher frequency than men but the difference remains non-significant (39 versus 44% respectively; $p=0.438$). In addition, we found no difference among sex for the type of mutation found in each biomarker; but however, women tend to exhibit more *KRAS* transition mutations than men (table 5).

Taking all these data together, 77 (27%) patients were considered “pan-negative” (all biomarkers found were wild type; or at least wild-type *EGFR*, *KRAS* and *ALK* simultaneously). In the remaining 284 patients with complete data, the most common alteration found was an *EGFR* mutation (in 51% of patients), followed by an *ALK* rearrangement (8%), a missense mutation in *KRAS* (6%), *HER2* (3%), *BRAF* (3%) and *PI3KCA* (<1%). Only 2% carried multiple mutations (see fig. 2). Therefore, 73% of French never-smokers carried a targetable molecular alteration.

Discussion

Among French never-smokers with lung cancer, we found that occupational exposure to carcinogens was significantly higher in men than in women, whereas domestic exposure, both to passive smoking and to cooking-oil, was higher in women. Most of the tumours we studied (73%) carried a targetable mutation.

To our knowledge, our study is the largest and most comprehensive ever conducted that focused on LCINS in a European population. Indeed, most published cohort studies used a retrospective design, were dedicated to Asian populations and/or explored only a single or a small subset of risk factors simultaneously. In Europe, the EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) cohort hosted 97 newly diagnosed lung cancer cases [15]. In Asia, a paper from Kim *et al.* [16], recently reported to be the largest and most comprehensive series on never-smokers, effectively analysed 229 Asian patients, using a retrospective review for *EGFR*, *KRAS* and *ALK*. Kawagushi *et al.* [17] also keep a prospective registry of never-smoker from Japan, Singapore, Korea as well as few patients in US, but they only reported their results on passive smoking exposure.

Our main findings are consistent with published literature. In fact, Clément-Duchêne *et al.* [18] have already shown, in 67 French never-smokers, that occupational exposure and passive smoking were differently distributed between the sexes. Indeed, some lung cancers are known to be related to domestic pollution exposure, although modestly, even in Europe [19]. Regarding biomarker distribution, we have shown that French never-smokers carry 73% of targetable mutations. This finding situates French never-smoker between Asian (more than 80%) and American (55%) never-smokers [1, 20, 21].

Our study does carry some limitations. First, due to financial constraints, we had no control patients. Thus, our cohort could not be used in order to estimate any risk ratios. However, our only aim was to assess the prevalence of known lung cancer risk factors and explore their actual distribution among certain subgroups. In order to put our findings into perspective, our data were compared to those of two recently published, nationwide epidemiological studies assessing the main features of French lung cancer smoker patients: 1) the KBP-CPHG 2010 study, which includes 6246 lung cancers in smokers, for demographical,

Q9

Q10

TABLE 4 Mutation patterns observed in the BioCAST study

Q18

Mutation by biomarker and exon	Number of mutations in the same patient			Total n	% of gene	% of total
	One	Two	Three			
BRAF						
Exon 15						
V600E	7	1	1	9		
L597L		1		1		
Total				10		5%
EGFR						
Exon 18						
G719C	1	1		2		
G719A	1			1		
Unspecified	1	1		2		
Total				5	3%	
Exon 19						
Deletion	74	2		76		
Unspecified	12			12		
Total				88	58%	
Exon 20						
c.2303_2305delinsTCT	1			1		
T790M		1		1		
S768I		1		1		
Insertion	4			4		
Duplication	1			1		
Deletion	1			1		
Unspecified		1		1		
Total				10	7%	
Exon 21						
L858R	33	3		36		
L861Q	4	1		5		
Unspecified substitution	4			4		
P848L		1		1		
Unspecified	2	1		3		
Total				49	32%	
Unspecified	1			1		
Total				1	1%	
Total				153		70%
PI3KCA						
Exon 9						
E545K		2		2		
Unspecified substitution	1			1		
Unspecified			1	1	80%	
Exon 20						
Unspecified			1	1	20%	
Total				5		2%
HER2						
Exon 20						
Unspecified substitution	1			1		
Unspecified insertion	5			5		
Unspecified duplication	2			2		
Total				8		4%
KRAS						
Exon 2						
G13D	1			1		
G12V	7	1		8		
G12R	1			1		
G12G	1			1		
G12D	4			4		
G12C	1			1		
G12A	2			2		
Unspecified	1	1		2		
Total				20		9%
ALK						
Unspecified	23	1		24		
Total				24		11%
Total	197	20	3	220		100%

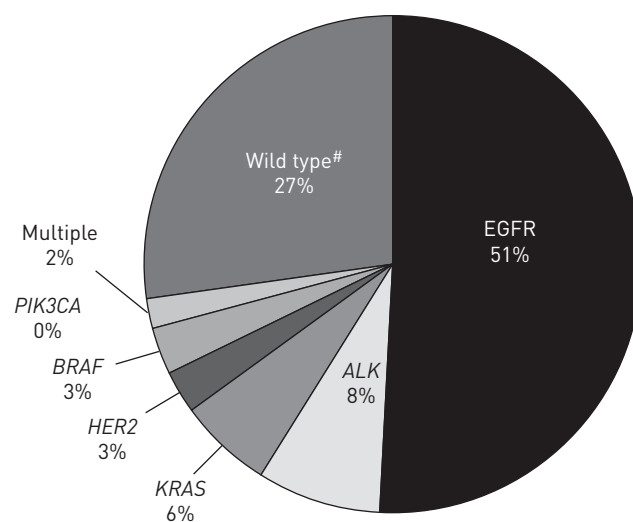
TABLE 5 Mutation profile for each biomarker according to sex

	Lung cancer in never smokers (BioCAST)			Lung cancer in ever smokers [#]
	Men	Women	p-value	
Total n				384
EGFR				7789
Patients n				340
Wild type	35 (61)	158 (56)	0.438	193 (57)
Mutation	22 (39)	125 (44)		147 (43)
Data missing	1	6		7
in exon 18	1/21 (5)	2/119 (2)	NC	3/140 (2)
in exon 19	12/21 (57)	73/119 (61)		85/140 (61)
in exon 20	0	7/119 (6)		7/140 (5)
in exon 21	8/21 (38)	37/119 (31)		45/140 (32)
KRAS				
Patients n				293
Wild type	50 (94)	223 (93)	1.0 [¶]	273 (93)
Mutation	3 (6)	17 (7)		20 (7)
Data missing		2		2
Transition	0	6/15 (40)	0.515 [¶]	6/18 (33)
Transversion	3/3 (100)	9/15 (60)		12/18 (67)
ALK				
Patients n				192
Wild type	29 (94)	139 (86)	0.379 [¶]	168 (88)
Mutation	2 (6)	22 (14)		24 (13)
BRAF				
Patients n				222
Wild type	34 (94)	178 (96)	0.667 [¶]	212 (95)
Mutation	2 (6)	8 (4)		10 (5)
HER2				
Patients n				201
Wild type	32 (94)	161 (96)	0.625 [¶]	193 (96)
Mutation	2 (6)	6 (4)		8 (4)
PI3KCA				
Patients n				187
Wild type	30 (97)	153 (98)	0.519 [¶]	183 (98)
Mutation	1 (3)	3 (2)		4 (2)

Data are presented as n [%] or n/N available [%], unless otherwise stated. #: Data from Biomarker France [22]; [¶]: Fisher's exact test; all other are Chi-squared test.

Q19

FIGURE 2 Final diagnosis of biomarker analysis in the 284 patients with complete data. #: All biomarker are wild-type or at least EGFR and KRAS and ALK are wild-type. Double EGFR mutations are categorised under the EGFR category; missing data not shown.



histological and staging data [14] (table 1); 2) the “Biomarker-France” study, sponsored by IFCT and funded by French NCI (INCa), of which preliminary results were reported after inclusion of the first 7789 lung cancers from smokers, for mutation profile data [22] (table 5). Indeed, our data perfectly mirror both the clinical and biological features of ever-smoker lung cancer patients, as reported in those two large series, conducted in the same French background, during the same period of time as BioCAST [14]. However, most of the collected variables had never been assessed in comparable epidemiological studies, or according to smoking status and, thus, are lacking of any comparable data in independent series of patients. Besides, our findings were congruous with existing literature: lung cancer in never smoker is more frequent among women, and adenocarcinoma. In addition, the mutation profile in never smoker strongly differs from smokers [1]. A second critical point is the retrospective reporting of risk factor exposures by patients themselves, without any possibility for a biological exposure objective assessment. However, we tried to minimise interrogation and reporting biases (by using a standardised questionnaire with only two trained, dedicated interviewers), as well as memorisation bias (by delivering the questionnaire prior to the interview to provide more time to answer all questions, and by allowing post-interview revisions and additions). However, our study remains submitted to the recall bias. The third point is our modest accrual. Although our cohort is one of the largest in this specific field, comparative subgroup analysis was only based on small-number subsets. Therefore, our study lacked sufficient power for estimating differences between patient subsets. For instance, with only 65 patients in the male subgroup, we were able to detect a 23% difference with 80% power and a 0.05 alpha risk (using a bilateral test) [23]. This point is especially critical for mutations since all, except EGFR, deal with small numbers. In addition, our study emphasised exposure patterns that have occurred over the last decades, and it thus did not reflect current occupational and social changes that may result in distinct exposure profiles. Finally, our analysis is restricted to biomarkers tested in the routine setting in France. Thus, some important biomarkers commonly expressed in never smokers such as ROS1 (6% in never smokers) and RET rearrangements were not included in this study [24, 25].

In spite of these limitations, our study carries some strength. First, the never-smoker inclusion criterion was very strict although consensual (fewer than 100 cigarettes in the lifetime) and was checked by physician at inclusion and by staff during interview. Indeed, many studies may be biased, by assessing the “non-smoker” status retrospectively from medical charts, with a risk of overlapping between former- and never-smoker. We also checked for alternative smoking and can thus ensure the lack of contamination from any former (or even very light) smokers. Another noteworthy strength is our comprehensive approach. We collected data on possible exposures to most known or supposed risk factors (including a detailed investigation of occupational exposure), as well as medical data and comprehensive information from tumour biomarker analysis.

This paper reports descriptive finding of the large cohort of European LCINS. Based on these data, we will provide in future papers the main differences in clinical and molecular epidemiology regarding exposure to main risk factors such as passive-smoking, occupational exposure, domestic pollution or reproductive factors [26]. In addition, some new data will result from collaboration with French national institutions for assessment of radon exposure and atmospheric pollution exposure into the BioCAST cohort. Lastly, the population-attributable fraction for most known risk factors of LCINS will be computed taking all this data into account [27].

In conclusion, this study, the largest and most comprehensive analysis of LCINS in a European population, reports differences in age and carcinogen exposure distribution by gender, and emphasizes the crucial role of targetable somatic mutations in this specific population. Physicians facing a never-smoker with a lung cancer should keep in mind that two-thirds of men underwent an occupational exposure and that three-quarters of patients may carry a targetable mutation. The BioCAST/IFCT-1002 study is also an interesting tool for investigating biomarker profiles according to numerous risk exposures and further results are expected soon.

Acknowledgements

The authors thank M. William Lebossé (Junior Research Assistant), who performed interviews with patients; M. Quan Tran and Antoine Deroy (Data Manager, IFCT); Pascale Missy (PhD, IFCT), who provided administrative support; each investigator in the 75 BioCAST participating centres; the patients and their families, who greatly contributed to this work by giving their time to prepare the questionnaire and participate in the interview.

The collaborators of the BioCAST/IFCT-1002 study were: Pierre-Jean Souquet, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Lyon Sud, Lyon; Radj Gervais, Centre François Baclesse, Caen; Hélène Doubre, Hôpital Foch, Suresnes, Paris; Eric Pichon, Centre Hospitalier Universitaire de Tours, Tours; Adrien Dixmier, Centre Hospitalier d'Orléans, Orléans; Isabelle Monnet, Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Paris; Bénédicte Mastroianni, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Louis Pradel, Lyon; Michel Vincent, Hôpital Saint-Joseph, Lyon; Jean Tredaniel, Hôpital Saint Joseph, Paris; Marielle Perrichon, Centre Hospitalier de Bourg-en-Bresse, Bourg-en-Bresse; Pascal Foucher, Centre Hospitalier Universitaire Bocage, Dijon; Bruno Coudert, Centre Georges-François Leclerc, Dijon; Denis Moro-Sibilot, Centre Hospitalier

Universitaire de Grenoble, Grenoble; Eric Dansin, Centre Oscar Lambret, Lille; Patrick Dumont, Centre Hospitalier de Chauny, Chauny; Lionel Moreau, Centre Hospitalier de Colmar, Colmar; Didier Debievre, Centre Hospitalier de Mulhouse, Mulhouse; Jacques Margery, Hôpital d'Instruction des Armées de Percy, Clamart, Paris; Elisabeth Quoix, Centre Hospitalier Universitaire de Strasbourg, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg; Bernard Duvert, Centre Hospitalier de Montélimar, Montélimar; Laurent Cellerin, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Hôpital Nord Laennec, Nantes; Nathalie Baize, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers; Bruno Taviot, Centre Médical Nicolas de Pontoux, Chalon-sur-Saône; Marie Coudurier, Centre Hospitalier Chambéry, Chambéry; Jacques Cadranet, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Tenon, Paris; Patrick Chatelain, Centre Hospitalier d'Annemasse, Annemasse; Jérôme Virally, Centre Hospitalier Intercommunal d'Aulnay-Sous-Bois, Paris; Virginie Westeel, Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, Besançon; Sylvie Labrune, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Ambroise Paré, Boulogne, Boulogne; Laureline le Maignan de Kerangat, Centre Hospitalier Général Le Mans, Le Mans; Jean-Marc Dot, Hôpital d'Instruction des Armées Desgenettes, Lyon; Sébastien Larive, Centre Hospitalier de Mâcon, Mâcon; Christos Chouaid, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Paris; Daniel Coëtmeur, Centre Hospitalier Général de Saint-Brieuc, Saint-Brieuc; Clarisse Audigier-Valette, Centre Hospitalier Intercommunal de Toulon, Toulon; Jean-Pierre Gury, Centre Hospitalier Intercommunal de Vesoul, Vesoul; Luc Odier, Centre Hospitalier de Villefranche sur Saône, Villefranche sur Saône; Tsellina Desfemmes-Baleyte, Centre Hospitalier Universitaire de Caen, Caen; Yannick Duval, Centre Hospitalier de Cannes, Cannes; Patrick Merle, Centre Hospitalier Universitaire de Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand; Gilles Devouassoux, Hospices Civils de Lyon, Hôpital de la Croix Rousse, Lyon; Reza Azarian, Centre Hospitalier de Versailles, Versailles; Patricia Barre, Centre Hospitalier de Cahors, Cahors; Olivier Raffy, Centre Hospitalier de Chartres, Chartres; Philippe Masson, Centre Hospitalier de Cholet, Cholet; Stéphanie Dehette, Centre Hospitalier de Compiègne, Compiègne; Caroline Toussaint Batbedat, Centre Hospitalier de Lagny-sur-Marne, Paris; Gérard Oliviero, Centre Hospitalier de Longjumeau, Paris; Marc Derollez, Polyclinique du Parc, Maubeuge; Nadine Paillot, Centre Hospitalier Régional de Metz, Metz; Jérôme Dauba, Centre Hospitalier de Mont De Marsan, Mont De Marsan; Dominique Herman, Centre Hospitalier de Nevers, Nevers; Jean-Michel Rodier, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat, Paris; Suzanna Bota, Centre Hospitalier Universitaire de Rouen, Rouen; Philippe Brun, Centre Hospitalier de Valence, Valence; Geneviève Letanche, Clinique de Vénissieux Lyon; Mohamed Khoms, Centre Hospitalier d'Annonay, Annonay; Béatrice Gentil-Lepecq, Centre Hospitalier de Bourgoin-Jallieu, Bourgoin-Jallieu; Philippe Ravier, Cabinet de Pneumologie, Dijon, Dijon; Yassine Hammou, Clinique Mutualiste, Lyon; Fabrice Barlesi, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Hôpital Nord, Marseille; Hélène Laize, Centre Hospitalier de Rambouillet, Rambouillet; Pierre Fournel, Institut de Cancérologie de la Loire, Saint-Priest en Jarez; Christelle Clement-Duchene, Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, Vandoeuvre-Les-Nancy; Joël Castelli, Centre Hospitalier Départemental Castelluccio, Ajaccio; Sophie Schneider, Centre Hospitalier de Bayonne, Bayonne; Antoine Levy, Centre Hospitalier Jacques Cœur, Bourges; Jérôme Dauba, Centre Hospitalier de Dax, Dax; Geneviève Jolimoy, Centre d'Oncologie et de Radiothérapie du Parc, Dijon; Hervé Pegliasco, Fondation Hôpital Ambroise Paré, Marseille; Michel Poudenx, Centre Antoine Lacassagne, Nice; Alain Prevost, Institut Jean-Godinot, Reims; Philippe Romand, Centre Hospitalier de Thonon-les-Bains, Thonon-les-Bains; Laurence Bigay-Game, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse; Etienne Suc, Clinique St Jean Languedoc, Toulouse; all France.

References

- 1 Couraud S, Zalcman G, Milleron B, *et al.* Lung cancer in never smokers: a review. *Eur J Cancer* 2012; 48: 1299–1311.
- 2 Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers: a different disease. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 778–790.
- 3 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, *et al.* Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74–108.
- 4 Samet JM, Avila-Tang E, Boffetta P, *et al.* Lung cancer in never smokers: clinical epidemiology and environmental risk factors. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 5626–5645.
- 5 Mounawar M, Mukeria A, Le Calvez F, *et al.* Patterns of EGFR, HER2, TP53, and KRAS mutations of p14arf expression in non-small cell lung cancers in relation to smoking history. *Cancer Res* 2007; 67: 5667–5672.
- 6 Mazières J, Peters S, Lepage B, *et al.* Lung cancer that harbors a HER2 mutation: epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives. *J Clin Oncol* 2013; 31: 1997–2003.
- 7 Paik PK, Arcila ME, Fara M, *et al.* Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2046–2051.
- 8 Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, *et al.* Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4247–4253.
- 9 Couraud S, Labonne S, Missy P, *et al.* [Lung cancer in never smokers: a French national cohort (BioCAST / IFCT-1002).] *Rev Mal Respir* 2013; 30: 576–583.
- 10 Bourgkard E, Wild P, Gonzalez M, *et al.* Comparison of exposure assessment methods in a lung cancer case-control study: performance of a lifelong task-based questionnaire for asbestos and PAHs. *Occup Environ Med* 2013; 70: 884–891.
- 11 Nowak F, Soria JC, Calvo F. Tumour molecular profiling for deciding therapy-the French initiative. *Nat Rev Clin Oncol* 2012; 9: 479–486.
- 12 Beau-Faller M, Degeorges A, Rolland E, *et al.* Cross-validation study for epidermal growth factor receptor and KRAS mutation detection in 74 blinded non-small cell lung carcinoma samples: a total of 5550 exons sequenced by 15 molecular French laboratories (evaluation of the EGFR mutation status for the administration of EGFR-TKIs in non-small cell lung carcinoma (ERMETIC) project: part 1). *J Thorac Oncol* 2011; 6: 1006–1015.
- 13 Beau-Faller M, Blons H, Domerg C, *et al.* A multicenter blinded study evaluating EGFR and KRAS mutation testing methods in the clinical non-small cell lung cancer setting: IFCT/ERMETIC2 Project Part 1: Comparison of testing methods in 20 French molecular genetic National Cancer Institute platforms. *J Mol Diagn* 2014; 16: 45–55.
- 14 Coëtmeur D, Briens E, Perrin C, *et al.* Lung cancer characteristics in 762 never- and 6,246 ever-smoker patients: Study KBP-2010-CPHG. *J Clin Oncol* 2014; 32: Suppl. 15, 1582.
- 15 Vineis P, Airolidi L, Veglia F, *et al.* Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study. *BMJ* 2005; 330: 277.

- 16 Kim HR, Shim HS, Chung JH, *et al.* Distinct clinical features and outcomes in never-smokers with nonsmall cell lung cancer who harbor EGFR or KRAS mutations or ALK rearrangement. *Cancer* 2012; 118: 729–739.
- 17 Kawaguchi T, Ando M, Kubo A, *et al.* Long exposure of environmental tobacco smoke associated with activating EGFR mutations in never-smokers with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 39–45.
- 18 Clément-Duchêne C, Vignaud JM, Stoufflet A, *et al.* Characteristics of never smoker lung cancer including environmental and occupational risk factors. *Lung Cancer* 2010; 67: 144–150.
- 19 Lissowska J, Bardin-Mikolajczak A, Fletcher T, *et al.* Lung cancer and indoor pollution from heating and cooking with solid fuels: the IARC international multicentre case-control study in Eastern/Central Europe and the United Kingdom. *Am J Epidemiol* 2005; 162: 326–333.
- 20 Sun Y, Ren Y, Fang Z, *et al.* Lung adenocarcinoma from East Asian never-smokers is a disease largely defined by targetable oncogenic mutant kinases. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4616–4620.
- 21 Paik PK, Johnson ML, D'Angelo SP, *et al.* Driver mutations determine survival in smokers and never-smokers with stage IIIB/IV lung adenocarcinomas. *Cancer* 2012; 118: 5840–5847.
- 22 Barlesi F, Blons H, Beau-Faller M, *et al.* Biomarkers (BM) France: Results of routine EGFR, HER2, KRAS, BRAF, PI3KCA mutations detection and EML4-ALK gene fusion assessment on the first 10,000 non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (pts). *J Clin Oncol* 2013; 31: Suppl. 15, 8000.
- 23 Machin D, Campbell MJ, Tan S-B, *et al.* *Sample size tables for clinical studies*. 3rd Edn. Hoboken, Wiley-Blackwell, 2008.
- 24 Lee SE, Lee B, Hong M, *et al.* Comprehensive analysis of RET and ROS1 rearrangement in lung adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2014; [in press DOI: 10.1038/modpathol.2014.107].
- 25 Kim HR, Lim SM, Kim HJ, *et al.* The frequency and impact of ROS1 rearrangement on clinical outcomes in never smokers with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol* 2013; 24: 2364–2370.
- 26 Couraud S, Dumont P, Moreau L, *et al.* Impact of Passive Smoking on molecular pattern in Never Smokers with Non-Small Cell Lung Cancer: Findings from the BioCAST / IFCT-1002 Study. Abstract#O18.04. *J Thorac Oncol* 2013; 8: Suppl. 2, S1–S1410.
- 27 Sisti J, Boffetta P. What proportion of lung cancer in never-smokers can be attributed to known risk factors? *Int J Cancer* 2012; 131: 265–275.

SUPPLEMENTAL FILES

Supplemental File S1 – Additional information on recorded data and exposure measurements

Supplemental Table S2 – Pathological and immune-histochemical features of the BioCAST cohort

Supplemental Table S3 – Tumor sample features and lung cancer stage

Supplemental Table S4 – Domestic pollution exposure according to gender

Supplemental Table S5 – Familial and personal medical history

Supplemental Table S6 – Reproductive factors and exposure to exogenous hormones among women

Supplemental Table S7 – Main molecular and clinicopathological features of patients harboring more than one biomarker mutation

Supplemental file S1 – Additional information on recorded data and exposure measurements

Here we aimed to provide additional information regarding data collected through patients' and physicians' questionnaires.

-Body mass index

Patients self-reported administrative height (in meters) and usual (before any unexpected weight loss) weight (in kilograms). Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by the square of the height (m). BMI was then classified into four categories according to the WHO global database on BMI adult classification¹²: underweight (<18.50kg/m²), normal range (18.50 - 24.99kg/m²), pre-obese (25.00 - 29.99kg/m²), and obese (≥30.00kg/m²).

-Geographical origin

We asked for patients' country of birth as well as for that of their parents and grandparents. We then categorized patients and their families according to the UN's classifications of countries by major area and region of the world.¹³ If the region was the same for the entire family, we categorized the patient under that region. In case of differences in the family, we considered the modal category to be correct. If there were two equal modal categories, we added the patient's region of birth to calculate a new mode, and thus the correct category. In one case only, this process failed to properly define the patient's origin, and we had to consider the major area instead of the region.

-Education level

There were seven categories: unschooled, graduated primary school, graduated secondary school, graduated high school (French *Baccalauréat*), and achieved 3, 5, or 8 (or more) years in university. The French *Certificat d'Aptitude Professionnel* and *Brevet d'Etudes Professionnelles* were considered high school graduation equivalents. Those who did not graduate from a given level were categorized in the level below.

-Passive smoke exposure

Domestic passive smoke exposure was defined as "living with at least one smoker during at least 1 year, in the same house." We also asked about exposure before the age of 18 years old (usually considered childhood).

¹² Available at http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html, last accessed May 30, 2013.

¹³ Available at <http://esa.un.org/unpd/wpp/Excel-Data/country-classification.pdf>, last accessed July 3, 2013

Passive smoking exposure at the workplace was defined as “working with at least one smoker, in the same closed room, for at least 1 year.” We retained only those who reported working with at least one smoker over the entire day (exposures during breaks or part-time days were excluded). For both domestic and workplace exposure, we asked each patient for the number of index smokers, cigarette consumption of each index smoker (in pack-years¹⁴), and the duration of exposure (in year).

We calculated cumulative time of exposure to passive smoking by summing years of exposure to each index-smoker. “Overall years of exposure” was calculated by summing cumulative time of exposure (years) in domestic and workplace settings. Then, we divided the results into tertiles in order to set up a categorical variable.

-Social status

There were five different categories: employed, unemployed, retired, disability, and other. Monks were classified as employed irrespective of their age. Stay-at-home spouses were classified as unemployed.

-Personal history of cancer

Two cancers occurring at the same site but separated by at least 5 years were considered two different diseases. All cancer sites, non-melanoma skin cancers included, were considered. For each cancer, we asked for the year of diagnosis and the kind of treatment undergone. Physicians were also consulted for this information. Both answers were used in order to complete the database.

-Familial history of lung cancer

Family history of lung cancer was considered only for biological first-degree relatives (spouses were excluded).

-Oral contraceptive (OC) drug and post-menopause hormone replacement therapy (HRT) intake

The questionnaire was followed with an annex sheet listing all oral contraceptive drugs and post-menopause hormone replacement therapies (HRT) approved in France (kindly provided by the French Agency for Drugs Safety, ANSM). Female patients reported the drug(s) used during their lifetimes.

We consulted the VIDAL® drug dictionary (VIDAL, Issy Les Moulineaux, France) in order to assess whether OC drugs contained ethinyl-estradiol (EE). If so, we checked if it was a continuous or a sequential dose regimen. Taking this variable into account, we calculated the total dose of EE delivered

¹⁴ One pack-year was defined as smoking one standard pack of cigarettes (n=20) per day during 1 year.

every 28 days. We then calculated the cumulative EE dose (in micrograms) by multiplying the dose delivered every 28 days by the reported duration of exposure (in years). For cumulative duration, we summed the durations of use for each patient.

We did the same with oral HRTs that contained estradiol. Cumulative estradiol doses were expressed in milligrams per 28 days. For non-oral HRTs, we only considered the transdermal route. Other local routes, such as vaginal route, were not taken into account. Finally, we calculated total cumulative estradiol intake by summing the doses from these two deliveries for each patient.

-Reproductive factors

We asked for age at menarche, at menopause, and at first live birth. We also asked for the number of pregnancies, of live births (parity), and of ovarian hormonal stimulations for pregnancy purpose. Finally, we asked about intake of certain specific drugs, such as digitalis and aromatase inhibitors.

-Cooking habits

Patients who were used to fried or stir-fried cuisine (at least one dish per week for at least 1 year) were asked to report the number of dishes prepared, as well as duration of exposure. We calculated the cooking dish-year (CDY) as follows: one cooked dish per day during 1 year = one CDY.¹⁵ We calculated fried and stir-fried CDY separately and then summed them. The presence of a hood in the kitchen was recorded for each home. We retained only the following indicator: “has ever lived (at least one year) in a house with a hood.”

-Exposure to indoor air pollution from heating and cooking

We asked patients to declare fuels used in their homes for heating and cooking (for at least 1 year). Patients “ever exposed” were those exposed for at least 1 year of their lifetime to a domestic non-solid fuel for heating or cooking. We distinguished solid and non-solid fuels for heating and cooking.¹⁶ Solid (traditional) fuels were: wood, coal, garbage burning, and wood pellets. Modern (non-solid) fuels were: gas, kerosene, electricity, air, oil, water, stones, and geothermal. Homes with no heating and/or cooking system were considered as “never exposed”. If heating fuels were not recorded, we looked for the heating

¹⁵ Yu ITS, Chiu Y-L, Au JSK, et al. Dose-response relationship between cooking fumes exposures and lung cancer among Chinese nonsmoking women. *Cancer Res.* 2006;66(9):4961–7.

¹⁶ Lissowska J, Bardin-Mikolajczak A, Fletcher T, et al. Lung cancer and indoor pollution from heating and cooking with solid fuels: the IARC international multicentre case-control study in Eastern/Central Europe and the United Kingdom. *Am. J. Epidemiol.* 2005;162(4):326–33.

system recorded (if any): stove, fireplace, and firebox were considered as “solid fuel exposure,” while oven, boiler, radiator, central heating, electricity, and gas were not. If two energy sources or systems were recorded simultaneously (for example, wood followed by electricity if the owner upgraded the house facilities), we considered that patient to have been “ever exposed” to the listed solid fuel for the recorded duration (even if we can logically assume that a part of this duration was spent without solid fuel exposure). We also included the duration of patients’ stays in given domiciles (at least 1 year) in the duration of exposure. Each patient’s cumulative exposure was calculated by adding durations of stay with solid fuels for either cooking or heating. We then used the duration of life between birth and diagnosis to calculate the percent of patients’ lifetime exposed to solid fuels. A cut-off value of 50% was considered relevant to identify high exposure.

-Home postal code

We recorded postal codes (with corresponding dates of residence) for further analysis on environmental atmospheric pollution and radon exposure. If the postal code was not recorded but the town name was, we searched for the postal code on the French National Addresses Service website¹⁷. If both the postal code and town name were missing, we reported the postal code of the main town in the department (if recorded).

-Occupational status and exposure

We only considered occupations held for at least 1 year. We used the 2008 edition of the International Standard Classification of Occupations (ISCO-2008) from International Labour Organization¹⁸ and the 2008 edition of the French classification of activities (NAF-2008) from the French National Institute of Statistics and Economic Studies.¹⁹ Both were used at their 4th levels. In both cases, if the code was not fully recorded (*i.e.*, not to the 4th level), we used free text in comment fields to complete it. The ISCO-2008 does not acknowledge housewives, the unemployed, the disabled, or students. However, the NAF recognizes housewives under the code 9820. French “*gendarmes*” were considered as policemen, and not military personnel.

¹⁷ Available at http://www.laposte.fr/sna/rubrique.php3?id_rubrique=59, last accessed May 30, 2013.

¹⁸ Available at <http://www.ilo.org/public/english/bureau/stat/isco/isco08/index.htm>, last accessed May 30, 2013.

¹⁹ Available at <http://www.insee.fr/en/methodes/default.asp?page=nomenclatures/naf2008/naf2008.htm>, last accessed May 30, 2013.

Occupational exposure to agents carcinogenic to the lungs was assessed via a specific 71-item questionnaire. Each item asked about exposure to a specific carcinogen and a specific activity. The number of years and frequency of exposure (Linkert scale from 1 to 5) were recorded. Then, a previously published algorithm was applied to the dataset in order to define a probability of exposure to each carcinogen agent for each task the patient performed.²⁰

-Personal history of disease

Patient's personal history of disease was compiled from both the patients' and the physicians' questionnaires. In case of a missing value on one, we used the other to complete the record. In case of inconsistent responses, we always kept the positive answer, regardless who gave it. For example, if a patient reported having a personal history of tuberculosis and the physician reported otherwise, we considered the patient to have had a history of tuberculosis. In case of disagreement on data such as dates, we kept the patient's answers. We searched both questionnaires for: human immunodeficiency virus infection, tuberculosis, pertussis, bronchiectasis, emphysema, asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), asbestos and pleural plaques, silicosis, lung fibrosis, other chronic lung disease, chronic arthritis, lupus or other connective or vasculitis disease, Crohn's disease or other chronic inflammatory bowel disease, solid organ transplantation, and liver cirrhosis. There were also two free text fields labelled "other personal disease."

Unfortunately, personal history of pneumonia was not systematically recorded. However, we asked both patients and physicians for "other lung diseases" and "other diseases." We were thus able to use answers to those fields to create a new "pneumonia" variable. If pneumonia (or broncho-pneumonia, but not bronchitis) was noted, we considered it (whether recorded by physician or patient). If no fields mentioned pneumonia (on either questionnaire), we considered the patient not to have a history of pneumonia. Finally, if both questionnaires provided a missing value, we reported the missing value. Lung "congestions" (n=2) and interstitial pneumonia (n=1) were considered to be pneumonia.

-Molecular analysis

²⁰ Bourgkard E, Wild P, Gonzalez M, et al. Comparison of exposure assessment methods in a lung cancer case-control study: performance of a lifelong task-based questionnaire for asbestos and PAHs. *Occup Environ Med*. 2013 Sep 18. doi: 10.1136/oemed-2013-101467. [Epub ahead of print].

We consulted the “Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer” (COSMIC) database²¹ for mutation definitions and used Amino-Acid code (AA) linkage for coding sequence identification (CDS). However, we did not extrapolate a CDS code from AA code alone.

If all biomarkers – *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, *PI3KCA*, *HER2*, and *BRAF* – were not tested in a given patient, we considered that patient: (i) “mutated” if one biomarker presented with a mutation; (ii) “multiple” if we found at least one mutation in at least two different genes; (iii) “wild-type” if at least *EGFR*, *KRAS*, and *ALK* were wild-type (regardless of whether *PI3KCA*, *HER2*, and *BRAF* were missing); (iv) “missing” if at least *EGFR*, *KRAS*, or *ALK* were missing (regardless all other results).

-Staging:

We used the 7th edition of TNM staging of lung tumors was used²².

-Pathological reports

Final pathological reports were collected. The 2004 WHO classification for lung tumors²³ and the IASLC / ERS / ATS classification for lung adenocarcinoma were used to categorize each tumor disease²⁴.

²¹ Available at <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>, last accessed May 30, 2013.

²² Groome PA, Bolejack V, Crowley JJ, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol.* 2007;2(8):694–705.

²³ Travis W, Brambilla E, Müller-Hermelink H. Pathology and genetics of Tumours of of the Lung, pleura, thymus and Heart. Lyon: IARC Press; 2004

²⁴ Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, 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(2):244–85.

Supplemental Table S2 – Pathological and immune-histochemical features of the BioCAST cohort

	Men		Women		P value	All		KBP-CPHG 2010, ref. 14 N=5347 ^a
	N=65	%	N=319	%		N=384	%	
Adenocarcinoma	55	85%	272	85%	0.893 _*	327	85%	50.6% ^b
ADC in situ	5	9%	8	3%		13	4%	
<i>Non-mucinous</i>	2	4%	7	3%		9	3%	
<i>Mucinous</i>	1	2%	-	-		1	<1%	
<i>Mixed</i>	2	4%	-	-		2	1%	
<i>In situ NOS</i>	-	-	1	<1%		1	<1%	
Minimally-invasive ADC	1	2%	6	2%		7	2%	
<i>Non-mucinous</i>	-	-	3	1%		3	1%	
<i>Mucinous</i>	1	2%	3	1%		4	1%	
Invasive ADC	34	62%	199	73%		233	71%	
<i>Lepidic</i>	2	4%	14	5%		16	5%	
<i>Acinar</i>	9	16%	45	17%		54	17%	
<i>Papillary</i>	3	6%	27	10%		30	9%	
<i>Micropapillary</i>	-	-	2	1%		2	1%	
<i>Solid predominant with mucin production</i>	6	11%	24	9%		30	9%	
<i>Invasive NOS</i>	14	26%	87	32%		101	31%	
Variant of invasive ADC	-	-	8	3%		8	2%	
<i>Invasive mucinous adenocarcinoma</i>	-	-	5	2%		5	2%	
<i>Colloid</i>	-	-	3	1%		3	1%	
ADC NOS	15	27%	51	19%		66	20%	
Squamous cell carcinoma	6	9%	23	7%	0.574 _*	29	8%	33.2%
Large cell carcinoma	2	3%	15	5%	0.562 _*	17	4%	12.5%
LCC with NE component	-	-	10	67%		10	59%	
Lymphoepithelial LCC	-	-	1	7%		1	6%	
LCC NOS	2	100%	4	27%		6	35%	
Adenosquamous carcinoma	1	2%	4	1%		5	1%	1.5% ^c
Sarcomatoid carcinoma	1	2%	3	1%		4	1%	2.2% ^d
Carcinoma NOS	-	-	2	1%		2	1%	
TTF-1 Immunohistostaining								
TTF-1 not required (missing)	3	5%	32	10%	0.077	35	9%	
TTF-1 negative	15	23%	43	14%		58	15%	
TTF-1 positive	47	72%	244	77%		291	76%	
<i>Adenocarcinoma</i>	44		226			270		
<i>Large cell carcinoma</i>	1		11			12		
<i>Other and NOS</i>	2		7		9			

^a Non-small cell lung cancers only; ^b includes adenocarcinoma and bronchiolo-alveolar subtypes; ^c
includes “mixed” category; ^d includes the “other” category

ADC: adenocarcinoma; NOS: not otherwise specified; LCC: large cell carcinoma; NE: neuroendocrine;

TTF-1: thyroid transcription factor -1; *Computed between the corresponding histologic subtype versus
other.

Supplemental Table S3 – Tumor sample features and lung cancer stage

		Lung cancer in never smokers (BioCAST)			Lung cancer in ever smokers (KBP-CPHG 2010 ref.14)
		N=384	%	%	N=6246
Sample type	Biopsy	347	90%		
	Cytology	37	10%		
Sample origin	Primitive tumor	263	69%		
	<i>Under bronchial endoscopy</i>	148	56%		
	<i>Under surgery</i>	46	18%		
	<i>Under CT scan</i>	69	26%		
	Node biopsy	25	7%		
	<i>Under mediastinoscopy or EBUS</i>	19	76%		
	<i>Susclavicular node</i>	6	24%		
	Metastasis biopsy	88	23%		
	<i>Bone metastasis</i>	15	17%		
	<i>Pleura</i>	50	57%		
	<i>Other metastasis</i>	23	26%		
	Other or NOS	8	2%		
Stage	Stage I	35	9%	15%	17%
	<i>Stage IA</i>	23	6%		
	<i>Stage IB</i>	12	3%		
	Stage II	22	6%		
	<i>Stage IIA</i>	8	2%		
	<i>Stage IIB</i>	14	4%	12%	25%
	Stage III	45	12%		
	<i>Stage IIIA</i>	30	8%		
	<i>Stage IIIB</i>	15	4%		
	Stage IV	278	73%	73%	59%
	Missing	4			
Metastasis	Bones ^a	119	43% ^b		
	Lung ^a	96	35% ^b		
	Pleura ^a	95	34% ^b		
	Brain ^a	63	23% ^b		
	Liver ^a	44	16% ^b		
	Adrenals ^a	26	9% ^b		
	Other ^a	39	14% ^b		

^a may cumulate

^b among Stage IV only

NOS: not otherwise specified; CT: computed tomography; EBUS: endo-bronchial ultrasound

Supplemental Table S4 – Domestic pollution exposure according to gender

		Men		Women		P-value	All	
		N	%	N	%		N	%
Cooking oil exposure								
Never exposed		47	82%	164	59%	0.001	211	63%
Ever exposed		10	18%	113	41%		123	37%
Exposure dose (CDY)	<10	3	33%	41	40%	NC	44	40%
	10 to 29	3	33%	51	50%		54	49%
	≥30	3	33%	10	10%		13	12%
	Missing	1	-	11	-	-	12	-
Missing		8	-	42	-	-	50	-
Exposure to solid fuels for cooking or heating								
Never exposed		12	21%	54	20%	0.819	66	20%
Ever exposed		44	79%	215	80%		259	80%
Exposure dose (% lifetime)	≤50%	30	68%	162	75%	0.323	192	74%
	>50%	14	32%	53	25%		67	26%
Missing		9	-	50	-	-	59	-

CDY: cooking dish-year; NC: not computable; all p-values were computed using a chi-squared test

Supplemental Table S5 – Familial and personal medical history

		Men		Women		<i>p</i> -value	All	
		<i>N</i>	%	<i>N</i>	%		<i>N</i>	%
First degree relative with lung cancer	None	30	52%	104	38%	0.134	134	40%
	One	16	28%	104	38%		120	36%
	Two or more	12	21%	68	25%		80	24%
	Missing	7	-	43	-		50	-
Personal history of at least one cancer^a		11	17%	53	17%	0.951	64	17%
Tuberculosis		3	5%	29	9%	0.234	32	8%
Pertussis		9	14%	71	22%	0.128	80	21%
Pneumonia^c		3	5%	21	7%	0.779 ^b	24	6%
Chronic bronchus disease^d		11	17%	39	12%	0.305	50	13%

^a all sites, non-melanoma skin included

^b Fisher's exact test; all other are chi-squared tests;

^c not systematically recorded, obtained from free texts;

^d emphysema, chronic bronchitis, asthma, and bronchiectasis

Supplemental Table S6 – Reproductive factors and exposure to exogenous hormones among women

			N=319	%
Menopause reached			253	92%
	Missing		43	
Age at menopause	Median $\pm$ IQR		50 $\pm$ 7	
	Missing ^a		17	
Age at menarche	Median $\pm$ IQR		13 $\pm$ 2	
	Missing		56	
Number of live birth	Median $\pm$ IQR		2 $\pm$ 2	
	Missing ^b		11	
Age at first live birth	Median $\pm$ IQR		23 $\pm$ 5	
	Missing ^c		43	
Oral contraceptive drugs	Never		161	58%
	Ever	All	115	42%
		≤ 10 years	67	65% ^c
		> 10 years	36	35% ^c
		Miss	12	
	Missing		43	
Post-menopause hormone replacement therapy (oral or transdermal)	Never		205	75%
	Ever	All	70	25%
		≤ 10 years	46	69% ^c
		> 10 years	21	31% ^c
		Miss	3	
	Missing		44	

^a among responding women who reached menopause (n=253);

^b nulliparous women excluded (n=31);

^c among ever users (non-missing)

Supplemental Table S7 – Main molecular and clinicopathological features of patients harboring more than one biomarker mutation

Pt	Sex	Histo	Biomarker#1	Mutation#1	Biomarker#2	Mutation#2	Biomarker#3	Mutation#3	Untested biomarker(s)	Final diagnose (figure 2)
#1	F	LCC NE	BRAF, E15	Sub. V600E	PI3KCA, E9	NOS	PI3KCA, E20	NOS		Multiple
#2	F	SCC	KRAS, E2	Codon 12 NOS	PI3KCA, E10	Sub. E545K			HER2	Multiple
#3	F	ADC	BRAF, E15	Sub. V600E	PI3KCA, E10	Sub. E545K				Multiple
#4	F	ADC	KRAS, E2	G12V	EGFR, E20	Sub. P848L			BRAF, ALK	Multiple
#5	F	ADC	EGFR, E21	NOS	EGFR, E20	NOS				EGFR
#6	F	ADC	EGFR, E19	Del. NOS	EGFR, E18	Sub. NOS			ALK	EGFR
#7	F	ADC	EGFR, E21	L858R	EGFR, E20	Sub. T790M			HER2, ALK	EGFR
#8	F	ADC	BRAF, E15	Sub. L597L	EGFR, E19	Del. E746-A750			HER2, ALK	Multiple
#9	F	ADC	EGFR, E18	Sub. G719C	EGFR, E21	Sub. L861Q			PI3KCA, BRAF, ALK	EGFR
#10	F	ADC	EGFR, E21	Sub. L858R	ALK	2p23			PI3KCA, HER2	Multiple
#11	F	SC	EGFR, E21	Sub. L858R	EGFR, E20	Sub. S768I			HER2, PI3KCA, BRAF, ALK	EGFR

F: female; E: exon; LCC NE: large cell carcinoma with neuroendocrine component; ADC: adenocarcinoma; SCC: squamous cell carcinoma; SC: sarcomatoid carcinoma; Sub.: substitution; Del.: deletion; NOS: not otherwise specified

IX. IMPACT DE L'EXPOSITION AUX FACTEURS DE RISQUE DE CANCER BRONCHO-PULMONAIRE SUR LE PROFIL MOLECULAIRE SOMATIQUE

A. Tabagisme passif

Le diagramme d'inclusion des patients inclus dans cette analyse est présenté dans la Figure 25.

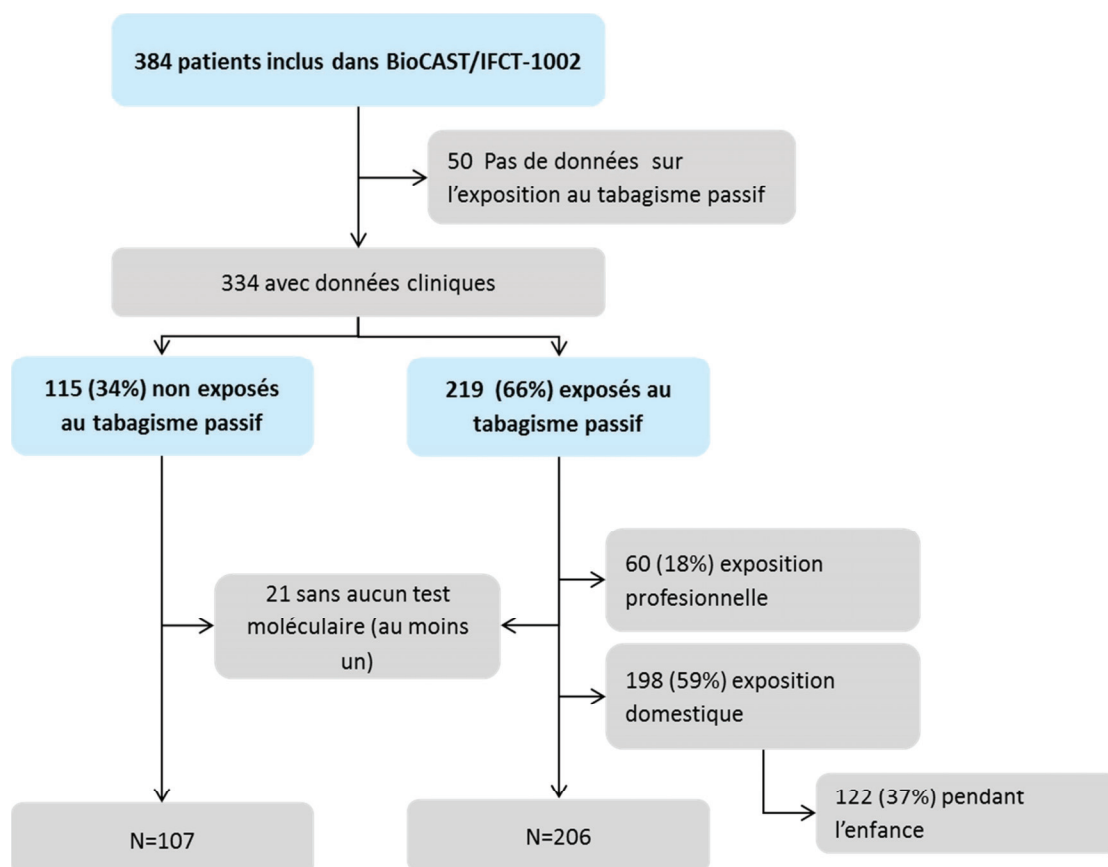


Figure 25 - Diagramme d'inclusion des patients inclus dans l'analyse du profil moléculaire selon l'exposition au tabagisme passif

La fréquence de mutation des trois principales anomalies (EGFR, KRAS et ALK) en fonction de l'exposition ou non puis de la durée cumulative d'exposition au tabagisme passif est présentée dans la Figure 26. La tendance à une diminution de la fréquence de mutation EGFR avec l'exposition croissante au tabagisme passif n'est pas significative en analyse uni-variée. De même, en analyse multi-variée, aucune différence significative n'est retrouvée (**Tableau 6**).

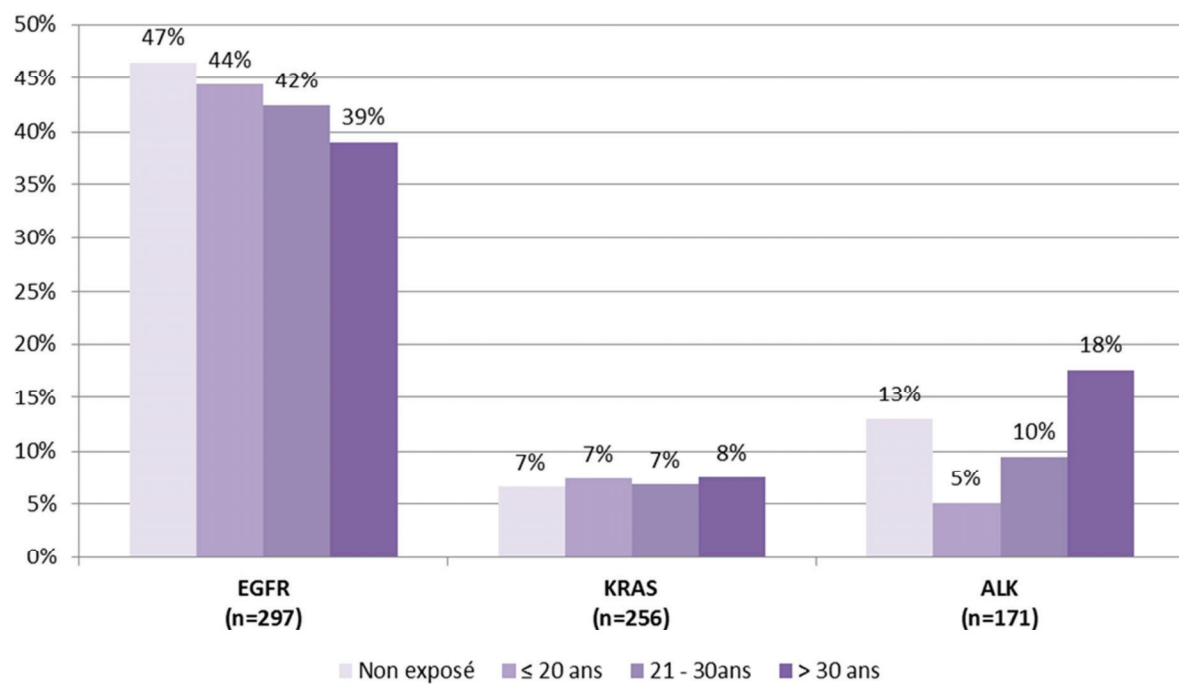


Figure 26 - Fréquence de mutation EGFR, KRAS et de réarrangement ALK en fonction de l'exposition au tabagisme passif

Tableau 6 - Analyse multivariée de la fréquence de mutation des biomarqueurs en fonction de l'exposition au tabagisme passif en prenant l'absence d'exposition comme référence et en utilisant un modèle multi-ajusté et un modèle ajusté sur l'âge et le sexe uniquement.

		Modèle N°1				Modèle N°2			
		OR ajust.	IC95%		p	OR ajust.	IC95%		p
EGFR	Exposé	0,80	0,47	1,36	0,41	0,81	0,49	1,32	0,40
	Non exposé	1,00			0,76				0,77
	exposé ≤20 ans	0,90	0,46	1,79	0,77	0,93	0,49	1,76	0,83
	exposé 20-30 ans	0,87	0,44	1,72	0,69	0,84	0,44	1,58	0,59
	exposé >30 ans	0,68	0,34	1,37	0,28	0,71	0,37	1,37	0,31
HER2	Exposé	1,48	0,27	8,26	0,65	1,59	0,31	8,26	0,58
	Non exposé	1,00			0,76				0,77
	exposé ≤20 ans	2,45	0,35	17,28	0,37	2,20	0,35	13,90	0,40
	exposé 20-30 ans	1,10	0,13	9,60	0,93	1,67	0,22	12,62	0,62
	exposé >30 ans	0,94	0,08	11,74	0,96	0,79	0,07	9,25	0,85
KRAS	Exposé	1,11	0,34	3,60	0,86	1,09	0,39	3,05	0,87
	Non exposé	1,00			0,95				1,00
	exposé ≤20 ans	1,24	0,29	5,21	0,77	1,19	0,32	4,46	0,80
	exposé 20-30 ans	0,86	0,19	3,86	0,85	1,03	0,27	3,87	0,96
	exposé >30 ans	1,31	0,30	5,78	0,72	1,07	0,28	4,13	0,92
BRAF	Exposé	0,55	0,12	2,57	0,45	0,82	0,22	3,05	0,76
	Non exposé	1,00			0,77				0,79
	exposé ≤20 ans	1,55	0,26	9,12	0,63	1,30	0,27	6,22	0,74
	exposé 20-30 ans	0,00	0,00		1,00	0,41	0,04	3,83	0,43
	exposé >30 ans	0,51	0,07	3,84	0,51	0,77	0,13	4,64	0,78
ALK	Exposé	1,35	0,39	4,71	0,64	0,76	0,28	2,09	0,60
	Non exposé	1,00			0,25				0,43
	exposé ≤20 ans	0,64	0,10	4,08	0,64	0,35	0,07	1,81	0,21
	exposé 20-30 ans	1,05	0,22	5,02	0,95	0,64	0,17	2,39	0,50
	exposé >30 ans	3,26	0,71	14,95	0,13	1,28	0,38	4,39	0,69

Modèle 1 ajusté sur: Sexe*, âge, IMC, nombre d'ascendant/descendant au 1er degré avec un antécédent de CBP, antécédent personnel de bronchopathie chronique*, type histologique*, exposition certaine à au moins un polluant professionnel*, pourcentage de vie exposé aux fumées de combustibles solides domestiques, exposition aux huiles de cuisson en plat-années, antécédent personnel d'infection respiratoire*. Modèle 2 ajusté sur âge et sexe*. * Variable catégorielle.

B. ARTICLE – RESULTATS de la fréquence de mutation des biomarqueurs tumoraux en fonction de l'exposition au tabagisme passif dans BioCAST (Sous presse, *European Respiratory Journal*).

Couraud S, Debieuvre D, Moreau L, Dumont P, Margery J, Quoix E, Duvert B, Cellerin L, Baize N, Taviot B, Coudurier M, Cadranet J, Missy P, Morin F, Mornex J-F, Zalcman G, and Souquet P-J, On Behalf Of The BioCAST/IFCT-1002 Study Investigators. No impact of Passive Smoke on the Somatic Profile of Lung Cancers in Never-Smokers. *Eur Respir J*. 2014 [In Press]

Communication orale associée

Couraud S, Dumont P, Moreau L, Debieuvre D, Margery J, Quoix E, Duvert B, Cellerin L, Baize N, Taviot B, Coudurier M, Cadranet J, Missy P, Zalcman G, Souquet P-J. Impact Of Passive Smoking On Molecular Pattern In Never Smokers With Non-Small Cell Lung Cancer: Findings From The BioCAST / IFCT-1002 Study. #O18.04. 15th World Conference on Lung cancer, Sydney, October 2013. *J Thorac Oncol*. 2013;8(Supp 2): S2-S1410



No impact of passive smoke on the somatic profile of lung cancers in never-smokers

Sébastien Couraud, Didier Debieuvre, Lionel Moreau, Patrick Dumont, Jacques Margery, Elisabeth Quoix, Bernard Duvert, Laurent Cellierin, Nathalie Baize, Bruno Taviot, Marie Coudurier, Jacques Cadranel, Pascale Missy, Franck Morin, Jean-François Mornex, Gérard Zalcman, Pierre-Jean Souquet and on behalf of the BioCAST/IFCT-1002 study investigators

Affiliation: For a list of the authors' affiliations see the Acknowledgements section.

Correspondence: Sébastien Couraud, Hospices Civils de Lyon, CH Lyon Sud, Service de Pneumologie, 165 chemin du Grand Revoyet, F-69495 Pierre Bénite Cedex, France. E-mail: sebastien.couraud@chu-lyon.fr

ABSTRACT *EGFR* and *HER2* mutations and *ALK* rearrangement are known to be related to lung cancer in never-smokers, while *KRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* mutations are typically observed among smokers. There is still debate surrounding whether never-smokers exposed to passive smoke exhibit a “smoker-like” somatic profile compared with unexposed never-smokers.

Passive smoke exposure was assessed in the French BioCAST/IFCT-1002 never-smoker lung cancer cohort and routine molecular profiles analyses were compiled.

Of the 384 patients recruited into BioCAST, 319 were tested for at least one biomarker and provided data relating to passive smoking. Overall, 219 (66%) reported having been exposed to passive smoking. No significant difference was observed between mutation frequency and passive smoke exposure (*EGFR* mutation: 46% in never exposed *versus* 41% in ever exposed; *KRAS*: 7% *versus* 7%; *ALK*: 13% *versus* 11%; *HER2*: 4% *versus* 5%; *BRAF*: 6% *versus* 5%; *PIK3CA*: 4% *versus* 2%). We observed a nonsignificant trend for a negative association between *EGFR* mutation and cumulative duration of passive smoke exposure. No association was found for other biomarkers.

There is no clear association between passive smoke exposure and somatic profile in lifelong, never-smoker lung cancer.



@ERSpublications

Never-smokers with lung cancer exposed to passive smoke do not have a smoker-like somatic mutation profile <http://ow.ly/Eheoi>

Q1

This article has supplementary material available from erj.ersjournals.com

Received: May 27 2014 | Accepted after revision: Nov 10 2014

Clinical trial: This study is registered at www.clinicaltrials.gov with identifier number NCT01465854.

Support statement: The BioCAST/IFCT-1002 study was funded by research grants from AstraZeneca, Boehringer-Ingelheim, Lilly, Pfizer, Pierre-Fabre and Roche. Those awarding funding had no role in the design, analysis or interpretation of the results, and the authors thus worked independently.

Conflict of interest: Disclosures can be found alongside the online version of this article at erj.ersjournals.com

Copyright ©ERS 2014

Introduction

Approximately one-third of adults and 40% of children are exposed to second-hand smoke worldwide, which accounts for 1% of all-cause mortality [1]. This exposure is estimated to cause >21000 lung cancer-related deaths annually. Passive smoking is a well-known risk factor for lung cancer in never-smokers (LCINSs) [2]. Lifelong never-smokers living with a smoker have an estimated 26% increased risk of lung cancer (95% CI 1.07–1.47), with both a dose–response and dose–duration relationship [3]. Similar results have been found for exposure in the workplace and during childhood [4, 5]. In a recent French study, we reported that 66% of LCINSs had been exposed to passive smoke, especially women and those exposed in domestic settings [6, 7].

The somatic mutation pattern in non-small cell lung cancers (NSCLCs) can vary widely according to smoking status. Never-smokers are known to carry a higher frequency of *EGFR* (epidermal growth factor receptor) and *HER2* (human epidermal growth factor receptor 2)/*ERBB2* (v-Erb-b2 avian erythroblastic leukaemia viral oncogene homologue 2) mutations, and *ALK* (anaplastic lymphoma kinase) rearrangement. In contrast, *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue), *BRAF* (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homologue B) [2, 8–12] and *PIK3CA* (phosphatidylinositol-3-kinase, catalytic subunit α) [8] mutations are thought to be linked to active smoking.

We thus hypothesised that the profile of somatic mutation in patients who were never-smokers and exposed to passive smoking could represent a “smoker-like” pattern, potentially differing from the profile of never-smokers who had never been exposed to passive smoking. Controversial results have been reported regarding an *EGFR* mutation profile of never-smokers exposed to passive smoking that proved similar to those observed in smokers [13–16]. It was our belief that in never-smokers, somatic alterations (*KRAS*, *BRAF* and *PIK3CA*) were more frequent, while *EGFR*, *HER2/ERBB2* and *ALK* alterations were not.

Here, we report the profile of the principal somatic alterations (*EGFR* and *KRAS* mutations, and *ALK* alteration) in a never-smoker BioCAST study, involving a large cohort of French LCINSs [17], according to their exposure to passive smoking, as well as for the profile of low-frequency mutations (*HER2/ERBB2*, *BRAF* and *PIK3CA*). Our study applied a multivariate approach and, overall, we found no significant difference.

Method

Population

For this study, we used data from the nationwide BioCAST/IFCT-1002 cohort of LCINSs in France. The study design has been reported elsewhere [18] and our principal results were recently published [7]. Briefly, BioCAST is a prospective, multicentre, observational study designed to describe the clinical, pathological and molecular epidemiology of LCINSs in a French population. This study enrolled consecutive, newly diagnosed NSCLC patients who professed themselves to be never-smokers (smoked <100 cigarettes in their lifetime). Patients were surveyed using a standardised questionnaire during a pre-planned phone interview with a member of the study team. This 17-page questionnaire requested information on demographics, occupational exposure [19], exposure to domestic pollution, and personal and familial medical history, as well as some lifestyle, hormonal and reproductive factors (women only). Additional medical data were collected directly from participating physicians.

The study was conducted in 75 centres throughout metropolitan France, from November 1, 2011, to January 31, 2013, and sponsored by the French Intergroup for Thoracic Oncology (IFCT). The IFCT research staff was in charge of administrative management and quality assurance in compliance with international research standards.

The Sud-Est IV (Lyon, France) ethics committee approved the study protocol on September 13, 2011. The Advisory Committee on Information Processing for Health Research (CCTIRS) authorised the use of a computerised database on September 8, 2011, and the National Commission for Data Protection (CNIL) was consulted on September 23, 2011, in accordance with French law. The BioCAST study was registered on the US National Institutes of Health website, at www.clinicaltrials.gov, under the identifier NCT01465854.

Within the BioCAST dataset used for the study, we determined patients who were self-declared as having ever been exposed to passive smoking, and had at least one biomarker test available for *EGFR*, *HER2*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* and *ALK*.

Passive smoking exposure

Passive smoking exposure was self-declared by patients and reported on the standardised questionnaire. Exposure to passive smoke in a domestic setting was defined as “living in the same house as at least one

smoker for at least 1 year". Passive smoking exposure at the workplace was defined as "working with at least one smoker in the same closed room for at least 1 year". For this category, we retained only those who declared having worked with at least one smoker for the entire day, excluding exposure during breaks only or part-time days. Overall exposure was defined as a patient who reported being "ever exposed" to passive smoking either in a domestic setting or the workplace, or both. We also asked if patients had been exposed in a domestic setting before the age of 18 years old, usually considered as childhood age, or not.

For each patient declared as ever exposed, we additionally asked for the number of index smokers and the number of years of exposure to each index smoker. We then proceeded to calculate two additional variables for each domestic and workplace exposure: 1) the cumulative duration of exposure (CDE), computed as the sum of years exposed to passive smoking from each identified index-smoker; and 2) passive smoker-years (PSYs), computed as number of index smokers multiplied by the number of years of exposure to each index smoker. The corresponding variables for overall exposure to passive-smoke were obtained from a sum of the values calculated in a domestic setting and in the workplace.

Tumour somatic mutation analysis

The French National Cancer Institute (INCa) launched a network of 28 molecular genetics platforms, which provide routine cancer molecular testing for all patients [20]. Despite the variability of sample processing and analysis techniques in the corresponding laboratories, previous studies have reported the high quality of these analyses in thoracic oncology [21]. Each participating BioCAST physician was asked to systematically order tests for somatic mutations in *EGFR* and *KRAS*, as well as in the *ALK* fusion gene, to be recorded on its local labelled platform. Investigator sites were also encouraged to additionally request *BRAF*, *HER2* and *PIK3CA* mutation analyses, which are also routinely performed on these platforms. All centres were allowed to forego further mutation testing if one mutation known to exclude the others was found. The final, detailed results of these analyses were collected for each patient. We consulted the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer for the purposes of categorising observed *KRAS* mutations in transversion (G>T or G>C) or transition (G>A or T>C). Given that most somatic mutations are mutually exclusive in the majority of lung cancer cases [11], we considered patients tested for at least *EGFR* and *KRAS* mutations, as well as *ALK* alterations, as "wild type", which was also optional for *HER2*, *BRAF* and *PIK3CA* tests, and for no mutation found in any tested biomarkers.

Statistics

Categorical variables are presented as percentages. Proportion comparison was conducted with the Chi-squared test, if the expected count in each category was at least 5, or with Fisher's exact test if not. To express the uncertainty of estimated probabilities, we have reported 95% Wilson confidence intervals. We used the one-sample Kolmogorov-Smirnov test to assess the plausibility of normal distribution assumption for continuous variables. Normally distributed continuous variables were expressed in mean and standard deviation. Means comparisons were performed applying the two-sided Student's t-test. Differences in distribution of continuous variables between two independent samples were assessed by the Mann-Whitney U-test. Continuous variables were also classed into tertile categories. We applied a binary logistic regression model to assess the risk of mutation for each considered gene. We generated three models: 1) unadjusted (crude odds ratios); 2) adjusted for sex and age only; and 3) comprehensively adjusted for the majority of potential confounding factors. Missing values were reported as such and all tests were two-sided. All statistics were performed by means of the SPSS V20 software (IBM SPSS Statistics, New York, USA).

Results

Population and passive smoking exposure

Of the 384 patients included in BioCAST, 334 presented complete data on overall passive smoke exposure and 219 (66%) reported being "ever exposed" to passive smoke overall (domestic or workplace). At least one biomarker was tested in 313 patients (fig. 1). The main population characteristics are presented in table 1.

Overall, 283 index smokers were responsible for the passive smoke domestic exposure reported by 198 LCINs (122 patients reported an exposure beginning at childhood and 76 beginning during adulthood only) (table 2). Patients were exposed to a median (interquartile range) of 1 (1) index smoker. Most index smokers were parents (44%) and spouses (47%). In total, 60 patients reported exposure in their workplace. The median CDE was 24 (20) years in a domestic setting, 15 (25) years in the workplace and 26 (22) years overall.

Profile of EGFR, KRAS and ALK according to passive smoke exposure

Overall, 127 somatic mutations were detected in 297 tested samples of the *EGFR* gene, 18 mutations in 256 samples of *KRAS* and 20 in 171 of *ALK* rearrangement. The frequencies of somatic mutations in these biomarkers are presented according to exposure to overall passive smoke in table 3. There was no significant difference in any biomarker in terms of ever having been exposed to passive smoke compared to never having been exposed. When considering the CDE in years divided into tertiles, the frequency of *EGFR* mutation decreased as CDE increased (from 46% in never-exposed patients to 39% in highly exposed patients, defined as >30 years of cumulative exposure), though the difference was not statistically significant. Moreover, the frequency of *ALK* rearrangement appeared to increase as the CDE increased (from 5% for the lowest tertile to 18% for the highest), while the frequency of alteration in never-exposed patients was 13%.

Table 4 presents odds ratios for the likelihood of somatic mutation according to exposure to overall passive smoke for three logistic regression models. These are unadjusted, adjusted for age and sex, and additionally adjusted for body mass index, number of relatives with lung cancer, personal history of chronic bronchus diseases or respiratory infection, histology, definite occupational exposure, percentage of lifetime exposed to solid fuels for cooking and heating, and cooking dish-years (reflecting exposure to cooking oil fumes). As before, we found no significant association for any gene for ever *versus* never exposure. However, the previously found trend for *EGFR* mutation frequency decrease correlating with CDE increase remained, although still at statistically nonsignificant levels, as was the case for the *ALK* trend.

There was no significant difference between female and male patients for any variables or biomarkers. Similarly, we found no significant results when restricting analysis to solely domestic or workplace exposure, nor when considering PSYs divided into tertiles (data not shown).

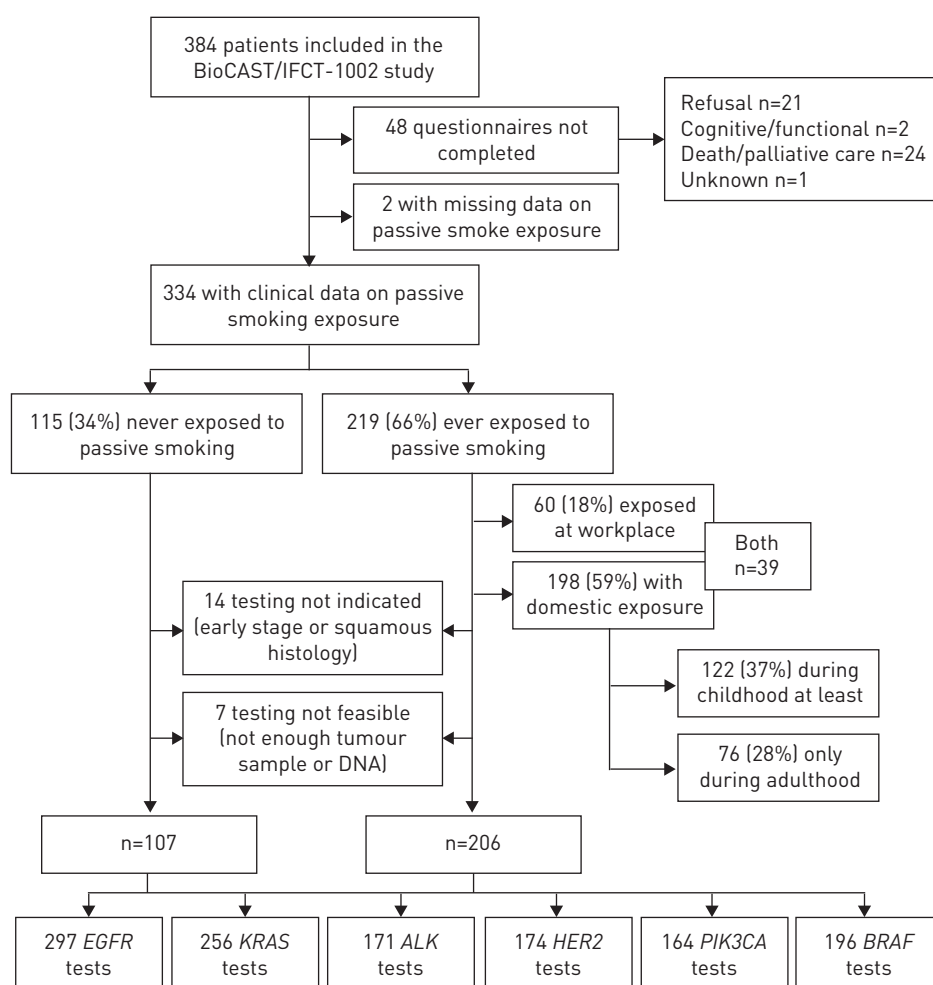


FIGURE 1 Study flow chart. *EGFR*: epidermal growth factor receptor; *KRAS*: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue; *ALK*: anaplastic lymphoma kinase; *HER2*: human epidermal growth factor receptor 2; *PIK3CA*: phosphatidylinositol-3-kinase, catalytic subunit α ; *BRAF*: v-Raf murine sarcoma viral oncogene homologue B.

TABLE 1 Main characteristics of the population according to overall exposure to passive smoking

	All	Never exposed to passive smoking	Ever exposed to passive smoking [#]	p-value
Subjects n	334	115	219	
Males n (%)	58 (17)	30 (26)	28 (13)	0.002
Age years mean$\pm$sd	70 $\pm$ 12	69 $\pm$ 12	70 $\pm$ 12	0.399
Origin n (%)				
Europe	302 (90)	105 (91)	197 (90)	0.690
Other	32 (10)	10 (9)	22 (10)	
BMI kg·m⁻² median (IQR)	24 (5)	25 (5)	24 (6)	0.508
Relatives[¶] with lung cancer				
0–1 n (%)	252 (76)	95 (83)	157 (72)	0.022
≥ 2 n (%)	80 (24)	19 (17)	61 (28)	
Missing n	2	1	1	
Personal medical history n (%)				
Any cancer	62 (19)	20 (17)	42 (19)	0.317
Chronic bronchial disease [*]	49 (15)	16 (14)	33 (15)	0.777
Lung infection [§]	112 (34)	43 (37)	69 (32)	0.279
Solid fuel exposure^f				
>50% of lifetime n (%)	67 (26)	26 (29)	41 (24)	0.465
Missing n	75	24	51	
Cooking oil exposure				
≥ 10 cooking dish-years ^{###} n (%)	67 (21)	21 (19)	46 (22)	0.585
Missing n	12	5	7	
Definite occupational exposure				
≥ 1 carcinogenic agent ^{¶¶}	43 (13)	16 (14)	27 (12)	0.660
Missing n	1	1		
Age at menarche^{**} years median (IQR)	13 (2)	13 (2)	13 (2)	0.871
Missing n	13	3	10	
Parity^{††, §§} median (IQR)	2 (2)	2 (2)	2 (1)	0.022
Age at first live birth^{**} years median (IQR)	23 (5)	24 (5)	23 (5)	0.331
Missing n	22	12	20	
Age at menopause^{**} years median (IQR)	50 (7)	50 (5)	50 (7)	0.584
Missing n	40	10	30	
Hormone intake for contraception or HRT^{**}				
≥ 10 years n (%)	78 (30)	24 (30)	54 (30)	0.951
Missing n	17	6	11	
Histology n (%)				
Squamous cell carcinoma	29 (9)	10 (9)	19 (9)	0.317
Adenocarcinoma	285 (85)	95 (83)	190 (87)	
Other and NOS	20 (6)	10 (9)	10 (5)	
Stage				
I–IIIA n (%)	81 (25)	23 (20)	58 (27)	0.188
IIIB–IV n (%)	250 (76)	91 (80)	159 (73)	
Missing n	3	1	2	

BMI: body mass index; IQR: interquartile range; HRT: hormone-replacement therapy; NOS: not otherwise specified. [#]: domestic and or workplace; [¶]: first-degree biological relatives; ^{*}: includes asthma, chronic obstructive pulmonary disease, bronchiectasis and emphysema; [§]: includes pertussis, pneumonia and tuberculosis; ^f: cooking and heating; ^{###}: 1 cooking-dish-year was defined as frying or stir-frying one dish per day in 1 year; ^{¶¶}: includes asbestos, silica, chrome, diesel, paint and polycyclic aromatic hydrocarbons; ^{**}: among women only; ^{§§}: live birth.

We observed no differences in the distribution of mutation type (based on exons in *EGFR*, and the transversion or transition mechanism for *KRAS*) according to the exposure to overall passive smoke (table 5). However, there was a nonsignificantly higher frequency of *KRAS* transversion in patients exposed to passive smoke compared with those who were never exposed (82% versus 60%, respectively).

Profile of HER2, BRAF and PIK3CA according to passive smoke exposure

The univariate analysis results for low-frequency biomarkers have been provided in the table S1. We observed no significant association between somatic profile and exposure to passive smoke. Multivariate analyses were not performed due to the very low number of mutations and the expected wide 95% confidence intervals.

TABLE 2 Exposure to passive smoking in the BioCAST population

	Domestic exposure			Workplace exposure	Overall exposure ⁺
	Overall	Childhood [#]	Adulthood [¶]		
Exposure n (%)					
Never	136 (41)	212 (63)	258 (77)	274 (82)	115 (34, 95% CI 29–40)
Ever	198 (59)	122 (37)	76 (23)	60 (18)	219 (66, 95% CI 60–71)
Index smokers n median (IQR)	1 (1)			1 (1)	
Missing n				12	
PSYs median (IQR)	24 (20)	18 (6)	22 (19)	18 (24)	26 (23)
Missing n	4	5	1	12	8
CDE years median (IQR)	24 (20)	18 (6)	22 (19)	15 (25)	26 (22)
Missing n	4	5	1	1	3

n=334. IQR: interquartile range; PSY: passive smoker-year; CDE: cumulative duration of exposure. [#]: at least; [¶]: only; ⁺: domestic and workplace.

TABLE 3 Main somatic mutation profile according to exposure to passive smoking in univariate analysis

	EGFR [#]		KRAS [¶]		ALK ⁺	
	Mutations n (%)	p-value	Mutations n (%)	p-value	Rearrangements n (%)	p-value
Exposure to passive smoking						
Never	46 (46, 95% CI 36–56)	0.486	6 (7, 95% CI 3–15)	0.867	7 (13, 95% CI 6–26)	0.726
Ever	81 (41, 95% CI 34–49)		12 (7, 95% CI 4–13)		13 (11, 95% CI 6–19)	
Cumulative duration of exposure						
Never	46 (46)	0.866	6 (7)	NC	7 (13)	NC
≤20 years	28 (44)		4 (7)		2 (5)	
20–30 years	28 (42)		4 (7)		4 (10)	
>30 years	25 (39)		4 (8)		6 (18)	
Missing	3		1		2	
Time of exposure						
Never	53 (45)	0.799	8 (8)	0.940	7 (11)	0.522
Childhood	45 (41)		6 (7)		10 (15)	
Adulthood only	29 (43)		4 (7)		3 (8)	
Workplace exposure						
Never	105 (43)	0.942	15 (7)	0.643 ^f	18 (12)	0.442 ^f
Ever	22 (42)		3 (7)		2 (8)	
Domestic exposure						
Never	53 (45)	0.542	8 (8)	0.458 ^f	7 (11)	0.533 ^f
Ever	74 (41)		10 (7)		13 (12)	
Childhood exposure						
Never [§]	82 (44)	0.550	12 (7)	0.784	10 (10)	0.320
Ever	45 (41)		6 (7)		10 (15)	

p-values were calculated by the Chi-squared test unless otherwise stated. *EGFR*: epidermal growth factor receptor; *KRAS*: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue; *ALK*: anaplastic lymphoma kinase; NC: not computable. [#]: 297 tested samples; [¶]: 256 tested samples; ⁺: 171 tested samples; [§]: never-exposed to passive smoking and exposed during adulthood only; ^f: Fisher test.

Overall somatic profile

Figure 2 presents the frequency of mutation for each biomarker tested, according to CDE for passive smoke and in never-smokers never exposed to passive smoke.

Overall, 248 patients underwent a full biomarker analysis. The mutation profile, categorised by passive smoke exposure, is presented in figure S1. Once more, we observed the same trend for a decreasing frequency of *EGFR* mutation correlating with CDE increase. Interestingly, “wild-type” status often tended to increase along with CDE. The frequency of multiple mutations (more than one mutation in different genes) was stable across all categories.

TABLE 4 Odds ratios for somatic mutation according to passive smoking exposure and cumulative duration of exposure

	Crude		Adjusted for age and sex		Comprehensively adjusted [#]	
	OR (95% CI)	p-value	aOR (95% CI)	p-value	aOR (95% CI)	p-value
EGFR						
Exposure to passive smoking						
Ever	0.84 [0.52–1.37]	0.49	0.81 [0.49–1.32]	0.40	0.80 [0.47–1.36]	0.41
Never	1.00		1.00		1.00	
Cumulative duration of exposure						
≤20 years	0.96 [0.51–1.80]	0.89	0.93 [0.49–1.76]	0.83	0.90 [0.46–1.79]	0.77
20–30 years	0.88 [0.47–1.65]	0.69	0.84 [0.44–1.58]	0.59	0.87 [0.44–1.72]	0.69
>30 years	0.77 [0.41–1.45]	0.41	0.71 [0.37–1.37]	0.31	0.68 [0.34–1.37]	0.28
KRAS						
Exposure to passive smoking						
Ever	1.09 [0.40–3.01]	0.87	1.09 [0.39–3.05]	0.87	1.11 [0.34–3.60]	0.86
Never	1.00		1.00		1.00	
Cumulative duration of exposure						
≤20 years	1.12 [0.30–4.16]	0.87	1.19 [0.32–4.46]	0.80	1.24 [0.29–5.21]	0.77
20–30 years	1.04 [0.28–3.85]	0.96	1.03 [0.27–3.87]	0.96	0.86 [0.19–3.86]	0.85
>30 years	1.14 [0.31–4.25]	0.84	1.07 [0.28–4.13]	0.92	1.31 [0.30–5.78]	0.72
ALK						
Exposure to passive smoking						
Ever	0.84 [0.31–2.24]	0.73	0.76 [0.28–2.09]	0.60	1.35 [0.39–4.71]	0.64
Never	1.00		1.00		1.00	
Cumulative duration of exposure						
≤20 years	0.36 [0.07–1.85]	0.22	0.35 [0.07–1.81]	0.21	0.64 [0.10–4.08]	0.64
20–30 years	0.71 [0.19–2.60]	0.60	0.64 [0.17–2.39]	0.50	1.05 [0.22–5.02]	0.95
>30 years	1.44 [0.44–4.71]	0.55	1.28 [0.38–4.39]	0.69	3.26 [0.71–14.95]	0.13

aOR: adjusted odds ratio; *EGFR*: epidermal growth factor receptor; *KRAS*: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue; *ALK*: anaplastic lymphoma kinase. [#]: adjusted for sex (binary), age (continuous), body mass index (continuous), number of relatives with lung cancer (continuous), personal history of chronic bronchus diseases (binary), personal history of respiratory infection (binary), histology (adenocarcinoma, squamous cell carcinoma or other), definite exposure to any main bronchus carcinogen (binary), percentage of lifetime exposed to solid fuels for cooking and heating (continuous), and cooking dish-years (continuous).

TABLE 5 Distribution of mutation type according to exposure to overall passive smoking for *EGFR* and *KRAS*

	Never exposed	Ever exposed	p-value
EGFR			
Mutation in exon 18	0 (0)	3 (4)	NC
Mutation in exon 19	27 (60)	49 (60)	
Mutation in exon 20	2 (4)	3 (4)	
Mutation in exon 21	14 (31)	24 (30)	
Double mutation in <i>EGFR</i> gene	2 (4)	2 (2)	
Missing	1		
KRAS			
Transition [#]	2 (40)	2 (18)	0.547*
Transversion [¶]	3 (60)	9 (82)	
Missing	1	1	

Data are presented as n (%) or n, unless otherwise stated. *EGFR*: epidermal growth factor receptor; *KRAS*: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue; NC: not computable. [#]: G13D, G12G or G12D; [¶]: G12V, G12R or G12A.

Discussion

In this study, we demonstrated that the mutation profile was not affected by exposure to passive smoke in a French population of never-smoker lung cancer sufferers for any biomarker of the tested (*EGFR*, *KRAS*, *HER2*, *BRAF*, *PIK3CA* and *ALK*).

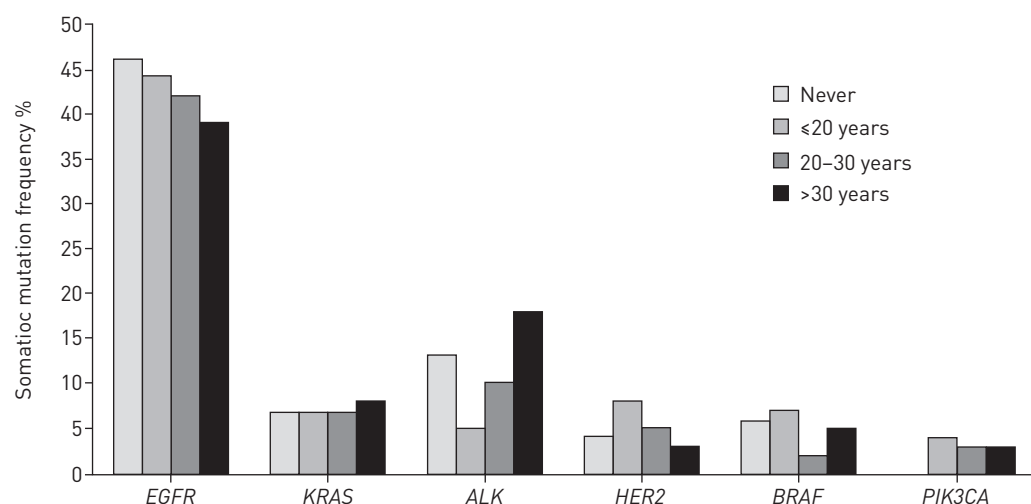


FIGURE 2 Somatic mutation pattern according to exposure to passive smoke for *EGFR* (epidermal growth factor receptor), *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue), *ALK* (anaplastic lymphoma kinase), *HER2* (human epidermal growth factor receptor 2), *BRAF* (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homologue B) and *PIK3CA* (phosphatidylinositol-3-kinase, catalytic subunit α).

There have been studies previously focused on this topic, such as the study by LEE *et al.* [13] involving 179 consecutive Asian LCINS patients with detailed self-reported data on environmental tobacco smoke exposure. Those authors found that passive smoke exposure negatively correlated with *EGFR* mutation frequency in a multivariate logistic regression model adjusted for sex and histology. That study also reported a trend for a dose-response relationship with PSYs, with a decreasing frequency of *EGFR* mutation observed when PSYs increased (OR for the highest quartile: 0.22, 95% CI 0.08–0.62). These results were consistent with those previously reported by TAM *et al.* [16] in 241 patients (all smoking statuses included), proving that passive smoke exposure tends to decrease the probability of *EGFR* mutation compared with never-smoking alone in univariate analysis (61.1% versus 74.8%, respectively; $p=0.257$). However, KAWAGUCHI *et al.* [14] reported contrasting findings in a population of 126 Asian LCINSs. They demonstrated that *EGFR* mutation frequency increased significantly among increasing CDE quintiles. In a multivariate model, which took into account sex, age and family history of cancer, they showed that CDE was positively linked to the incidence of an *EGFR*-activating mutation. The same team reported similar results at the 2013 World Lung Cancer Congress in 498 LCINSs of various ethnicities (425 from Asia). *EGFR* mutation was again positively associated, in a multivariate model, with CDE, though only in women (OR 1.084, 95% CI 1.003–1.171 ($p=0.0422$) for each 10-year CDE increase) [22]. Finally, TAGA *et al.* [15] reported their findings for 143 never- and long-term former smokers from two US cohorts. They observed a higher *EGFR* mutation frequency among patients who were not exposed to passive smoking compared with exposed patients in one of the two cohorts, while they found the opposite in the second cohort.

All these conflicting results could be explained by the inherent difficulty in accurately reporting passive-smoke exposure [23]. In all these studies, including our own, passive smoking is only self-reported by the patients. A biological assessment of passive smoking, such as blood plasma or urine cotinine concentration measurement [4], or even urinary 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol and its glucuronides [24], may be more reliable, yet is also more costly and thus not used in our study, nor in the other previously mentioned studies. Furthermore, biological assessment is only relevant for current, not former, exposure. The frequency of overall passive-smoke exposure differs strongly between each of these studies, despite a common definition: 135 (75%) out of 179 patients in the study by LEE *et al.* [13], 73 (51%) out of 143 patients in that by TAGA *et al.* [15], 124 (98%) out of 126 patients in that by KAWAGUCHI *et al.* [14] (445 (89%) out of 498 in the latest update [22]), 19 (9%) out of 241 patients in that by TAM *et al.* [16] and 219 (66%) out of 334 patients in our study. Moreover, some bias, such as memorisation or redaction bias, could occur when reporting this exposure. In addition, dose and duration variables may also be inappropriate for accurately assessing cumulative exposure. As an example, in our cohort, a barman exposed daily to passive smoking from many smokers over 10 years was unable to enumerate the number of index smokers to whom he had been exposed. Thus, we were only able to compute the CDE, which was 10 years. In contrast, someone exposed to two index smokers at the same time would have a CDE that was twice as long (20 years) as that of the barman. Similar concerns may occur for the PSY

variable. In addition, the population in which the studies were conducted differed from study to study, ranging from Asian only [13, 14, 16] to primarily Caucasian [7, 15], and from never-smoker only [13, 14] to all smoking statuses mixed [16]. These differences may also account for the conflicting results, as genomic susceptibility and confounding related to risk-factor exposure could differ depending on geographical origin [2, 25].

With the exception of *EGFR*, other oncogenes have been poorly investigated in this setting. *KRAS* mutation frequency was found not to differ between never-smokers and passive smokers (3.6% *versus* 0%, respectively; $p=1.000$) in one study [16]. In addition, KUBO *et al.* [22] and RYAN *et al.* [26] reported no association between passive smoke exposure and the frequency of *ALK* rearrangement.

Our findings suggest that passive smoking exposure is not the only risk factor for lung cancer in never-smokers, and possibly not the leading one either. This actually constitutes one of the possible reasons why mutation spectrum is not affected by indirect smoking exposure. These findings are in line with recent observations obtained by whole-genome sequencing [27]. Thus, some other risk factor may be suspected in this setting, such as environmental pollution (including natural radon and atmospheric pollution), occupational exposure, domestic pollution (cooking and heating fumes, or cooking oil), personal history of cancer or respiratory disease, or familial history of cancer supporting the role of genetic factors [2]. As BioCAST has a large dataset on exposure to these factors, we will fully explore these issues in further analysis. Electronic cigarettes should also be closely assessed for lung cancer risk in future studies.

Our study had some limitations. Firstly, the biomarker analyses were not centrally performed and used different processes depending on the centre. However, the performance and concordance of sample processing and mutation screening methods across participating centres had previously been investigated in blinded cross-validation studies, producing good results [21]. Secondly, except for *EGFR*, the number of mutations was low for all oncogenes, ranging from 18 for *KRAS* to four for *PIK3CA*. Our study may therefore lack power yet, to our knowledge, our cohort remains the largest and most comprehensive of its field in a European population. However, European descents are heterogeneous. Thirdly, we had to deal with some missing values, especially PSYs, along with the biomarker mutation testing, in which missing value rates ranged from 11% for *EGFR* to 51% for *PIK3CA* (fig. 1). Nevertheless, all missing values have been reported as such in the results section.

Our study also had some strengths. Firstly, inclusion was strictly restricted to never-smokers. In addition, we recorded a substantial amount of data about potential confounders and were able to compute a more comprehensive adjustment for most of them than other studies have. Secondly, this represents the largest study involving almost exclusively European-descent patients. It is also the first reported study investigating six of the major lung cancer oncogenes, namely *EGFR*, *KRAS*, *HER2*, *BRAF*, *PIK3CA* and *ALK*, concomitantly regarding passive smoke exposure. Thirdly, we collected all indicators of passive smoke exposure used in previous studies, such as CDE, PSYs, childhood exposure, *etc.*, in order to provide an easy and comprehensive comparison with others.

In conclusion, never-smoker patients with lung cancer exposed to passive smoke were found to not carry a smoker-like somatic mutation profile in terms of *EGFR*, *KRAS*, *HER2*, *BRAF*, *PIK3CA* and *ALK* together when compared to unexposed never-smoker patients. Passive smoking alone appeared to be insufficient to determine a somatic profile in lung cancer.

Acknowledgements

The authors' affiliations are as follows. Sébastien Couraud: Acute Respiratory Medicine and Thoracic Oncology Unit, Lyon Sud hospital, Hospices Civils de Lyon, Pierre Bénite, and Faculty of Medicine Lyon-Sud Charles Mérieux, Lyon 1 University, Oullins, France; Didier Debieuvre: Pulmonology and Thoracic Oncology Unit, Emile Muller hospital, Centre Hospitalier de Mulhouse, Mulhouse, France; Lionel Moreau: Respiratory Medicine, Hopitaux Civils, Colmar, France; Patrick Dumont: Respiratory Medicine and Thoracic Oncology Unit, Chauny Hospital, Chauny, France; Jacques Margery: Service des Maladies Respiratoires, Hôpital d'Instruction des Armées Percy, Clamart, France; Elisabeth Quoix: Department of Pneumology, NHC, Université de Strasbourg, Strasbourg, France; Bernard Duvert: Respiratory Medicine, Montélimar Hospital, Montélimar, France; Laurent Cellerin: Service de Pneumologie, Institut du Thorax, CHU de Nantes, Nantes, France; Nathalie Baize: Pôle des Spécialités Médicales et Chirurgicales Intégrées, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers, France; Bruno Taviot: Centre Médical Nicolas de Pontoux, Chalon sur Saône, France; Marie Coudurier: Pulmonology Unit and Thoracic Oncology Unit, Chambéry Hospital, Chambéry, France; Jacques Cadranet: AP-HP, Hôpital Tenon, Service de Pneumologie, and Sorbonne Université, UPMC Univ. Paris 06, GRC 04 Therascan, Paris, France; Pascale Missy: Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique, Paris, France; Franck Morin: Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique, Paris, France; Jean-François Mornex: Université Lyon 1, INRA UMR754, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; Gérard Zalcman: Pulmonology and Thoracic Oncology Dept, Caen University Hospital, UMR INSERM 1086, Caen Basse Normandie University, Caen, France; Pierre-Jean Souquet: Acute Respiratory Medicine and Thoracic Oncology Unit, Lyon Sud hospital, Hospices Civils de Lyon, Pierre Bénite, and Faculty of Medicine Lyon-Sud Charles Mérieux, Lyon 1 University, Oullins, France. The collaborators in the BioCAST/IFCT-1002 study were Pierre-Jean Souquet (Hospices Civiles de Lyon (HCL), Hôpital Lyon Sud, Lyon, France), Radj Gervais (Centre François Baclesse, Caen, France), Hélène Doubre (Hôpital Foch,

Suresnes, France), Eric Pichon (Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Tours, Tours, France), Adrien Dixmier (Centre Hospitalier (CH) d'Orléans, Orléans, France), Isabelle Monnet (Centre Hospitalier Intercommunal (CHI) de Créteil, Créteil, France), Bénédicte Mastroianni (HCL, Hôpital Louis Pradel, Lyon), Michel Vincent (Hôpital Saint-Joseph, Lyon, France), Jean Tredaniel (Hôpital Saint Joseph, Paris, France), Marielle Perrichon (CH de Bourg-en-Bresse, Bourg-en-Bresse, France), Pascal Foucher (CHU Bocage, Dijon, France), Bruno Coudert (Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France), Denis Moro-Sibilot (CHU de Grenoble, Grenoble, France), Eric Dansin (Centre Oscar Lambret, Lille, France), Patrick Dumont (CH de Chauny, Chauny, France), Lionel Moreau (CH de Colmar, Colmar, France), Didier Debieuvre (CH de Mulhouse, Mulhouse, France), Jacques Margery (Hôpital d'Instructions des Armées (HIA) Percy, Clamart, France), Élisabeth Quoix (CHU de Strasbourg, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg, France), Bernard Duvert (CH de Montélimar, Montélimar, France), Laurent Cellerin (CHU de Nantes, Hôpital Nord Laennec, Nantes, France), Nathalie Baize (CHU d'Angers, Angers, France), Bruno Taviot (CM Nicolas de Pontoux, Chalon-sur-Saône, France), Marie Coudurier (CH Chambéry, Chambéry, France), Jacques Cadranet (Assistance Publique (AP) Hôpitaux de Paris (HP), Hôpital Tenon, Paris), Patrick Chatellain (CH d'Annemasse, Ambilly, France), Jérôme Virally (CHI d'Aulnay-Sous-Bois, Aulnay-Sous-Bois, France), Virginie Westeel (CHU de Besançon, Besançon, France), Sylvie Labrune (AP-HP, Hôpital Ambroise Paré, Boulogne, France), Laureline Le Maignan de Kerangat (CHG Le Mans, Le Mans, France), Jean-Marc Dot (HIA Desgenettes, Lyon, France), Sébastien Larive (CH de Mâcon, Mâcon, France), Christos Chouaid (AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France), Daniel Coëtmeur (CHG de Saint-Brieuc, Saint-Brieuc, France), Clarisse Audigier-Valette (CHI de Toulon, Toulon, France), Jean-Pierre Gury (CHI de Vesoul, Vesoul, France), Luc Odier (CH de Villefranche sur Saône, Villefranche sur Saône, France), Gérard Zalcman (CHU de Caen, Caen, France), Yannick Duval (CH de Cannes, Cannes, France), Patrick Merle (CHU de Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France), Gilles Devouassoux (HCL, Hôpital de la Croix Rousse, Lyon, France), Reza Azarian (CH de Versailles, Versailles, France), Patricia Barre (CH de Cahors, Cahors, France), Olivier Raffy (CH de Chartres, Chartres, France), Philippe Masson (CH de Cholet, Cholet, France), Stéphanie Dehette (CH de Compiègne, Compiègne, France), Caroline Toussaint Batbedat (CH de Lagny-sur-Marne, Jossigny, France), Gérard Oliviero (CH de Longjumeau, Paris, France), Marc Derollez (Polyclinique du Parc, Maubeuge, France), Nadine Paillet (CHR de Metz, Thionville, France), Jérôme Dauba (CH de Mont De Marsan, Mont De Marsan, France), Dominique Herman (CH de Nevers, Nevers, France), Jean-Michel Rodier (AP-HP, Hôpital Bichat, Paris, France), Suzanna Bota (CHU de Rouen, Rouen, France), Philippe Brun (CH de Valence, Valence, France), Geneviève Letanche (Clinique de Vénissieux, Vénissieux, France), Mohamed Khomsi (CH d'Annonay, Annonay, France), Béatrice Gentil-Lepecq (CH de Bourgoin-Jallieu, Bourgoin-Jallieu, France), Philippe Ravier (Cabinet de Pneumologie, Dijon, France), Yassine Hammou (Clinique Mutualiste, Lyon, France), Fabrice Barlesi (AP-HM, Hôpital Nord, Marseille, France), Hélène Laize (CH de Rambouillet, Rambouillet, France), Pierre Fournel (Institut de Cancérologie de la Loire, Saint-Priest en Jarez, France), Christelle Clement-Duchene (CHU de Nancy, Vandoeuvre-Les-Nancy, France), Joël Castelli (CHD Castelluccio, Ajaccio, France), Sophie Schneider (CH de Bayonne, Bayonne, France), Antoine Levy (CH Jacques Cœur, Bourges, France), Jérôme Dauba (CH de Dax, Dax, France), Geneviève Jolimoy (Centre d'Oncologie et de Radiothérapie du Parc, Dijon, France), Hervé Pegliasco (Fondation Hôpital Ambroise Paré, Marseille, France), Michel Poudenx (Centre Antoine Lacassagne, Nice, France), Alain Prevost (Institut Jean-Godillot, Reims, France), Philippe Romand (CH de Thonon-les-Bains, Thonon-les-Bains, France) and Laurence Bigay-Game (CHU de Toulouse, and Etienne SUC, Clinique St Jean Languedoc, Toulouse, France).

This work was presented as an oral communication at the 15th World Conference on Lung Cancer in Sydney, Australia, on October 29, 2013 (presentation number O18.04) [17].

The authors wish to thank Stéphanie Labonne (research assistant) and William Lebossé (junior research assistant), who conducted the patient interviews; M. Quan Tran and Antoine Deroy (IFCT, Paris, France); all investigators in the 75 BioCAST participating centres; and the patients and their families who greatly contributed to this work by giving their time for answering the questionnaire and interview questions.

References

- Oberg M, Jaakkola MS, Woodward A, *et al.* Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. *Lancet* 2011; 377: 139–146.
- Couraud S, Zalcman G, Milleron B, *et al.* Lung cancer in never smokers – a review. *Eur J Cancer* 2012; 48: 1299–1311.
- Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ* 1997; 315: 980–988.
- Vineis P, Airolidi L, Veglia F, *et al.* Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study. *BMJ* 2005; 330: 277.
- 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: 125–131.
- Clément-Duchêne C, Vignaud J-M, Stoufflet A, *et al.* Characteristics of never smoker lung cancer including environmental and occupational risk factors. *Lung Cancer* 2010; 67: 144–150.
- Couraud S, Souquet PJ, Paris C, *et al.* BioCAST/IFCT-1002: Epidemiologic and Molecular Features of Lung Cancer in Never-Smoker. *Eur Respir J* 2014 [In press DOI: 10.1183/09031936.00097214].
- Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2011; 12: 175–180.
- Mazieres J, Peters S, Lepage B, *et al.* Lung cancer that harbors a *HER2* Mutation: epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives. *J Clin Oncol* 2013; 31: 1997–2003.
- Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, *et al.* Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor *EML4-ALK*. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4247–4253.
- Mounawar M, Mukeria A, Le Calvez F, *et al.* Patterns of *EGFR*, *HER2*, *TP53*, and *KRAS* mutations of p14^{arf} expression in non-small cell lung cancers in relation to smoking history. *Cancer Res* 2007; 67: 5667–5672.
- Paik PK, Arcila ME, Fara M, *et al.* Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring *BRAF* mutations. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2046–2051.

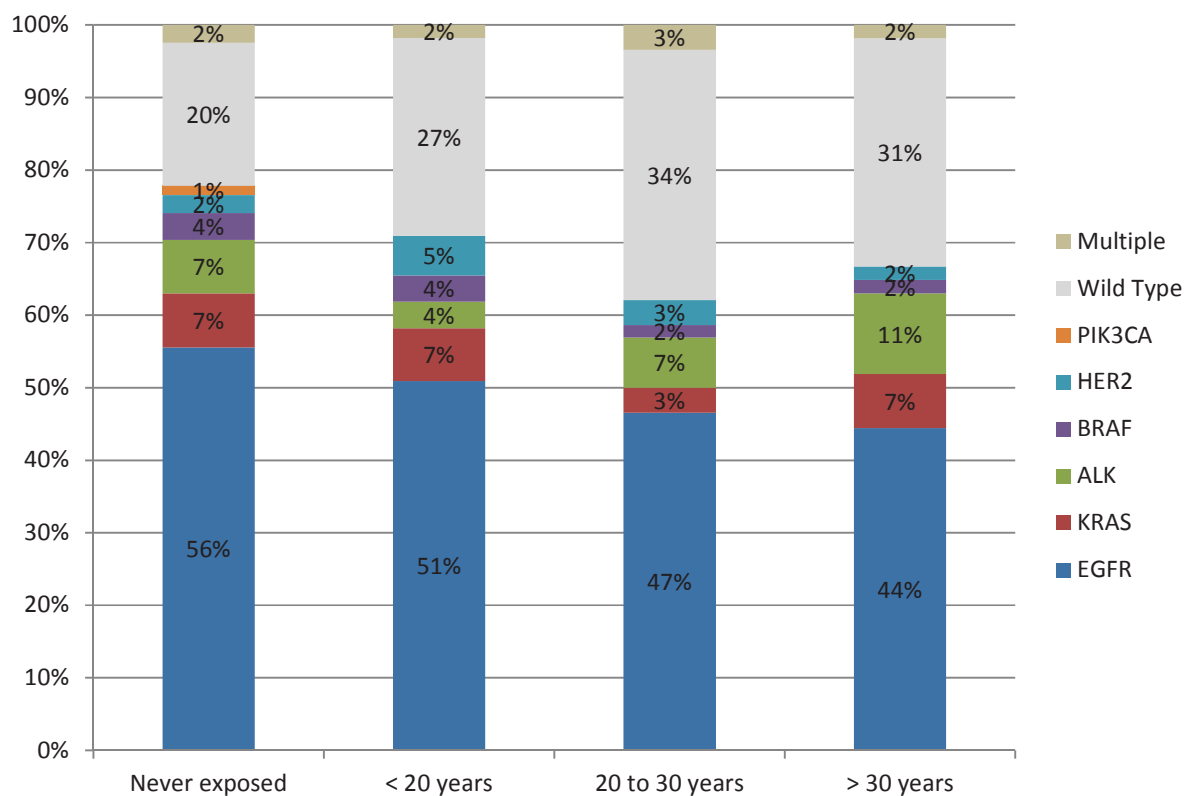
- 13 Lee YJ, Cho BC, Jee SH, *et al.* Impact of environmental tobacco smoke on the incidence of mutations in epidermal growth factor receptor gene in never-smoker patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 487–492.
- 14 Kawaguchi T, Ando M, Kubo A, *et al.* Long exposure of environmental tobacco smoke associated with activating *EGFR* mutations in never-smokers with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 39–45.
- 15 Taga M, Mechanic LE, Hagiwara N, *et al.* *EGFR* somatic mutations in lung tumors: radon exposure and passive smoking in former- and never-smoking U.S. women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012; 21: 988–992.
- 16 Tam IY, Chung LP, Suen WS, *et al.* Distinct epidermal growth factor receptor and *KRAS* mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1647–1653.
- 17 Couraud S, Souquet P-J, Paris C, *et al.* The BioCAST/IFCT-1002 study: a comprehensive overview of demographic, risk exposure and somatic mutations of non-small cell lung cancer occurring among French never smokers. *J Thorac Oncol* 2013; 8: Suppl. 2, S207–S208.
- 18 Couraud S, Labonne S, Missy P, *et al.* BioCAST: le Bio-observatoire national du cancer bronchiques chez les patients non fumeurs (IFCT1002) [Lung cancer in never smokers: A French national cohort (BioCAST/IFCT-1002)]. *Rev Mal Respir* 2013; 30: 576–583.
- 19 Bourgkard E, Wild P, Gonzalez M, *et al.* Comparison of exposure assessment methods in a lung cancer case-control study: performance of a lifelong task-based questionnaire for asbestos and PAHs. *Occup Environ Med* 2013; 70: 884–891.
- 20 Nowak F, Soria J-C, Calvo F. Tumour molecular profiling for deciding therapy-the French initiative. *Nat Rev Clin Oncol* 2012; 9: 479–486.
- 21 Beau-Faller M, Blons H, Domerg C, *et al.* A multicenter blinded study evaluating *EGFR* and *KRAS* mutation testing methods in the clinical non-small cell lung cancer setting – IFCT/ERMETIC2 Project Part 1: comparison of testing methods in 20 French molecular genetic National Cancer Institute platforms. *J Mol Diagn* 2014; 16: 45–55.
- 22 Kubo A, Masahiko A, Ross S, *et al.* Impacts of environmental tobacco smoke on *EGFR* mutations and *ALK* rearrangements in never smokers with non-small cell lung cancer: analyses on a prospective multinational ETS registry. *J Thorac Oncol* 2013; 8: Suppl. 2, S1–S1410.
- 23 Besaratinia A, Pfeifer GP. Second-hand smoke and human lung cancer. *Lancet Oncol* 2008; 9: 657–666.
- 24 Thomas JL, Guo H, Carmella SG, *et al.* Metabolites of a tobacco-specific lung carcinogen in children exposed to secondhand or thirdhand tobacco smoke in their homes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20: 1213–1221.
- 25 Bennett WP, Alavanja MC, Blomeke B, *et al.* Environmental tobacco smoke, genetic susceptibility, and risk of lung cancer in never-smoking women. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 2009–2014.
- 26 Ryan BM, Wang Y, Jen J, *et al.* Evidence that the lung Adenocarcinoma *EMLA-ALK* fusion gene is not caused by exposure to secondhand tobacco smoke during childhood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014; 23: 1432–1434.
- 27 Krishnan VG, Ebert PJ, Ting JC, *et al.* Whole-genome sequencing of Asian lung cancers: second-hand smoke unlikely to be responsible for higher incidence of lung cancer among Asian never-smokers. *Cancer Res* 2014; 74: 6071–6081.

Supplemental Table 1 – Somatic mutation profile according to exposure to passive smoking in univariate analysis

		Mut. in HER2 (n=174)		P value	Mut. in BRAF (n=196)		P value	Mut. in PIK3CA (n=164)		P value
		n	% [95%CI]		n	% [95%CI]		n	% [95%CI]	
Exposure to Passive Smoking	Never	2	4% [1%-13%]	1,0*	4	6% [2%-15%]	0.741*	2	4% [<1%-14%]	0.586*
	Ever	6	5% [2%-11%]		6	5% [2%-10%]		2	2% [<1%-6%]	
Cumulative duration of exposure	Never	2	4%	NC	4	6%	NC	2	4%	NC
	≤20 years	3	8%		3	7%		1	3%	
	20 to 30years	2	5%		1	2%		1	3%	
	>30 years	1	3%		2	5%		0	0%	
Time of exposure	Never	2	3%	NC	5	6%	NC	2	4%	NC
	Childhood	2	3%		2	3%		0	0%	
	Adulthood only	4	10%		3	7%		2	2%	
Exposure at workplace	Never	8	6%	0.225*	9	5%	0.568*	4	3%	0.559*
	Ever	0	0%		1	4%		0	0%	
Domestic exposure	Never	2	3%	0.330*	5	6%	0.359*	2	3.5%	0.433*
	Ever	6	6%		5	4%		2	1.9%	

Mut.: mutation; Rearr.: rearrangement; NC: not computable

*Fisher test; others are Chi-squared tests



Supplemental figure 1 – Biomarker pattern according to cumulative duration of exposure (CDE) to overall passive smoking in the 248 patients with full main biomarker analysis. Wild-type means that all biomarkers tested – with at least EGFR, KRAS, and ALK – were wild-type. Multiple means that more than one mutation – in different gene – was found in the same patient

C. Polluants professionnels

Le diagramme d'inclusion dans l'analyse du profil somatique en fonction de l'exposition est présenté dans la Figure 27. Seules les expositions certaines et probables ont été retenues.

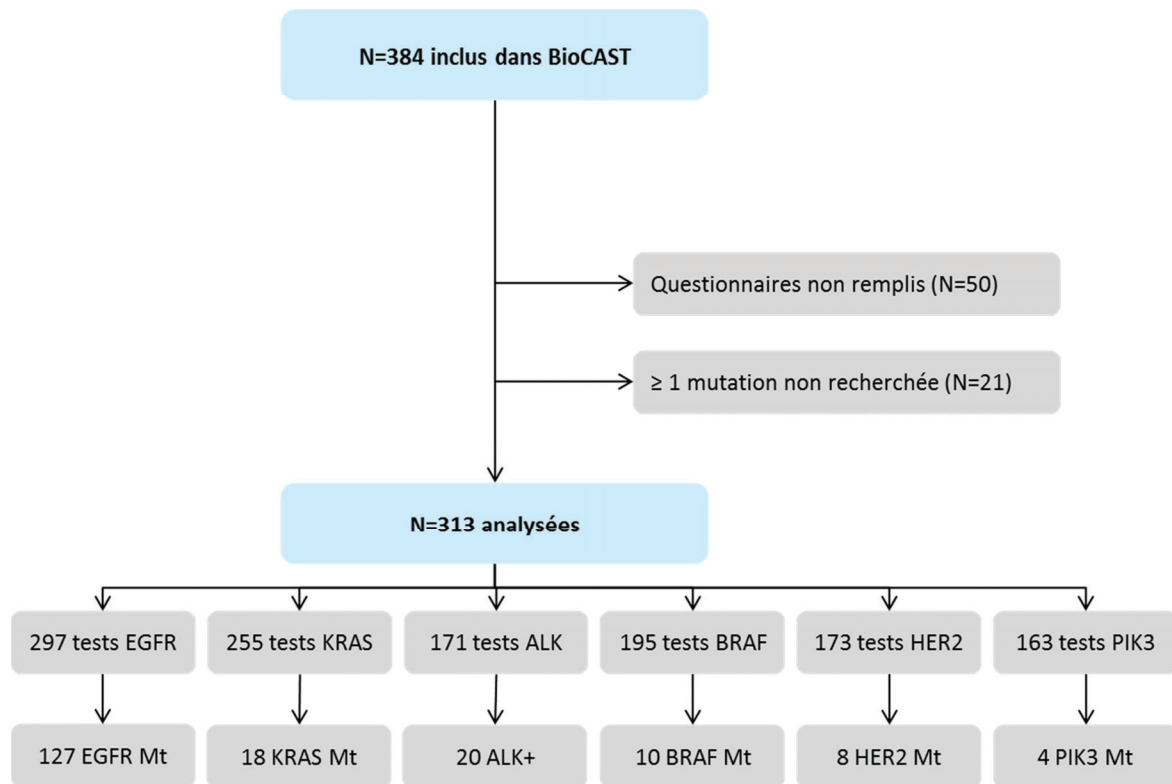


Figure 27 - Diagramme d'inclusion pour l'analyse du profil somatique en fonction de l'exposition professionnelle

Le Tableau 7 montre les effectifs et proportions d'exposition aux différents cancérrogènes d'origine professionnelle. Il montre également, ainsi qu'illustré par la Figure 28, que de nombreux patients présentent plusieurs expositions concomitantes.

Tableau 7 - Répartition des expositions aux cancérogènes professionnels selon leur type et leur nombre chez un même individu

		N	%
Type d'exposition possible ou certaine	HAP	30	9%
	Amiante	22	6,6%
	Silice	15	4,5%
	Diesel	8	2,4%
	Peintures	7	2,1%
	Chrome	7	2,1%
Nombre d'exposition par patient	Aucune	341	88,8%
	1 carcinogène	21	5,5%
	2 carcinogènes	9	2,3%
	3 carcinogènes	4	1,0%
	4 carcinogènes	7	1,8%
	5 carcinogènes	2	0,5%

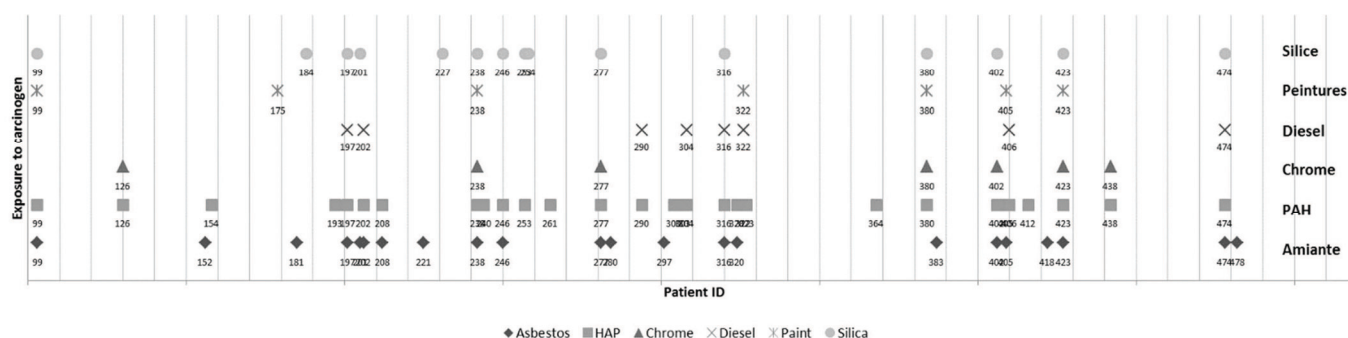


Figure 28 - Différentes expositions professionnelles de chacun des patients de la série

Les fréquences de mutations en fonction des différentes expositions aux carcinogènes d'origine professionnelle sont présentés dans la Figure 29 et la Figure 30.

On observe un profil très superposable pour les expositions à la silice et à l'amiante. Il existe en effet une fréquence de mutation EGFR significativement moins élevée en cas d'exposition à l'amiante comparés aux expositions faibles ou nulles (20% vs 44%, $p=0,033$). Bien que non significative et d'amplitude moindre, on retrouve une différence similaire pour les expositions à la silice (31% vs 43%). Cette différence n'est pas retrouvée dans les modèles d'analyse multi-ajustée mais il existe bien une tendance nette (Tableau 8). Il n'existe curieusement aucune anomalie d'ALK pour aucune des deux expositions.

On n'observe aucune différence notable dans le profil moléculaire en fonction de l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. Par contre, les profils de mutations selon l'exposition au chrome et au diesel sont très particuliers. Pour le diesel, les patients exposés ont soit une mutation de

l'EGFR soit une mutation de BRAF mais aucune autre n'est représentée. Pour le chrome, on trouve soit des mutations de l'EGFR soit des mutations HER2 et PIK3.

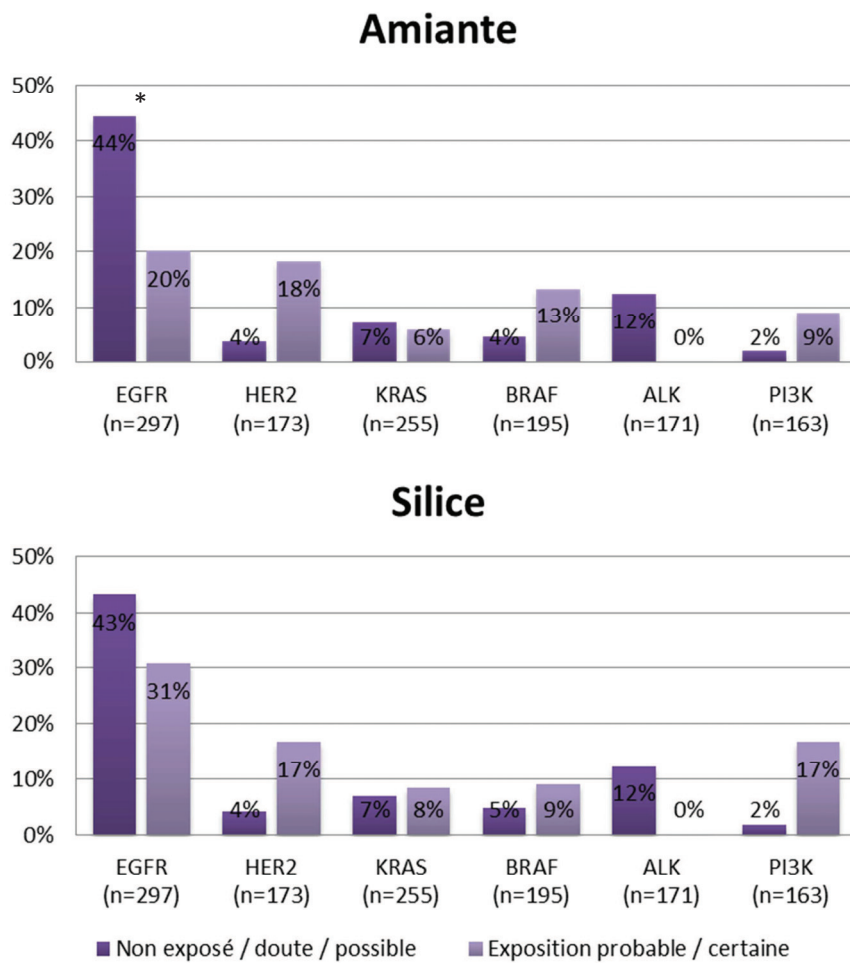


Figure 29 - Fréquence de mutation des biomarqueurs en fonction de l'exposition à l'amiante (haut) et à la silice (bas). *p=0,033, les autres sont NS.

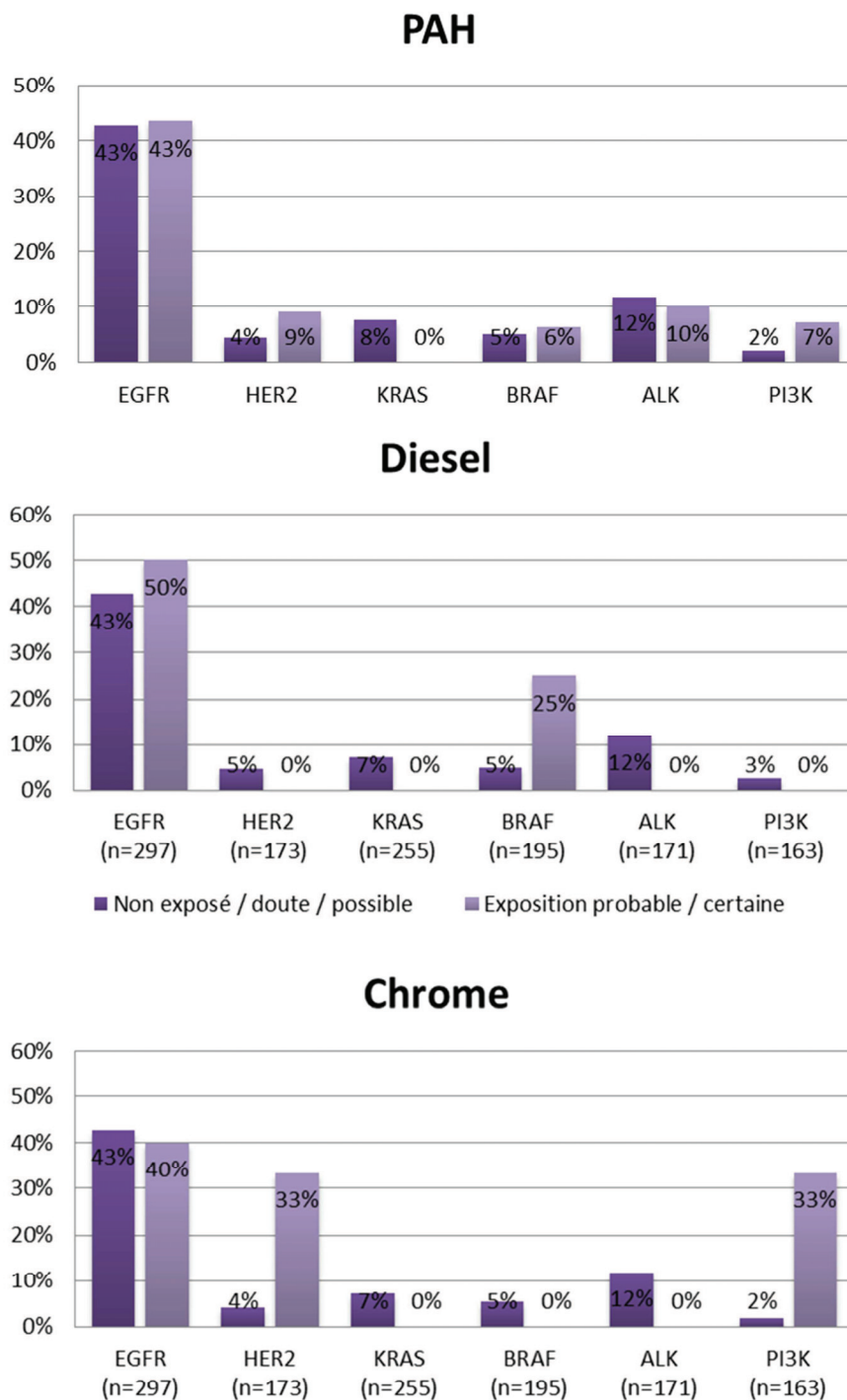


Figure 30 - Fréquence de mutation des biomarqueurs en fonction de l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (haut), au diesel (milieu) et au chrome (bas)

Tableau 8 - Résultats de l'analyse multivariée (variables pertinentes uniquement) concernant le profil de EGFR et HER2 en fonction de l'exposition aux cancérogènes professionnels

		OR ajust.	IC95%	p
EGFR	Amiante	0,350	[0,110 - 1,112]	0,075
	Silice	0,601	[0,171 - 2,114]	0,428
	PAH	1,215	[0,487 - 3,032]	0,676
	Diesel	1,413	[0,268 - 7,456]	0,684
	Chrome	1,257	[0,177 - 8,932]	0,819
HER2	Amiante	6,037	[0,789 - 46,200]	0,083
	Silice	2,820	[0,202 - 39,286]	0,440

Modèle ajusté sur le sexe, l'âge, le type histologique*, l'exposition cumulée au tabagisme passif.*

**Variables catégorielles*

D. Facteurs hormonaux

BioCAST s'est également intéressé au profil moléculaire en fonction des facteurs hormonaux et reproductifs chez les femmes. Le diagramme d'inclusion est présenté dans la Figure 31. Au total, 261 patientes ont été analysées, et près de 150 mutations ont été diagnostiquées. Les caractéristiques de la population analysée sont rapportées dans le Tableau 9.

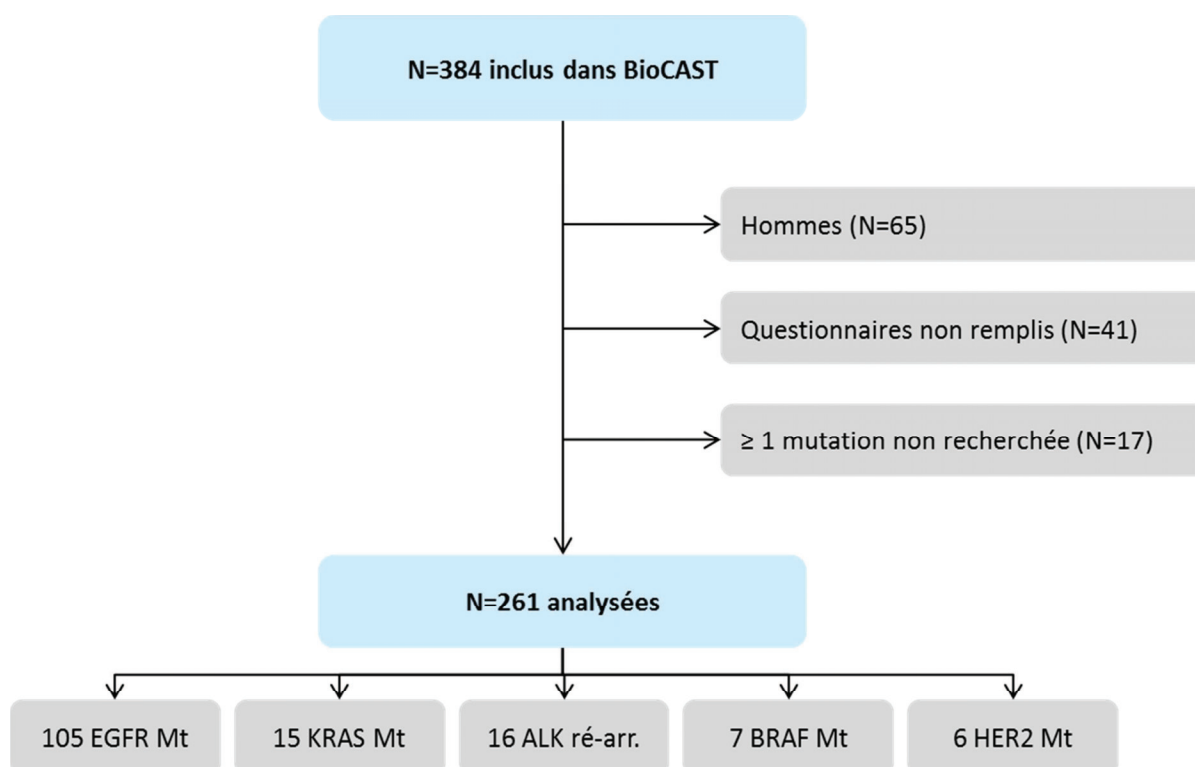


Figure 31- Diagramme des patients inclus dans l'analyse des facteurs hormonaux et reproductifs

Tableau 9 - Principales caractéristiques de patients inclus dans l'analyse sur les facteurs hormonaux et reproductifs.

		N = 261	%
Age	Moyenne $\pm$ ET (ans)	69.8 $\pm$ 11.0	
Niveau d'éducation	Lycée et plus	108	42%
	Collège	59	23%
	Jamais scolarisé / Primaire	91	35%
	Manquant	3	
Exposition au tabagisme passif	Oui	79	30%
	Non	180	70%
	Manquant	2	
Statut familial	Mariée, concubinage	152	58%
	Divorcée, séparée	29	11%
	Veuve	64	25%
	Célibataire	15	6%
	Autre	1	0%
IMC (kg/m ²)	Médiane $\pm$ IIQ	24.2 $\pm$ 5.5	
	Maigreur, normal	153	60%
	Surpoids	69	27%
	Obèse	34	13%
	Manquant	5	
Age Ménopause	Moyenne $\pm$ ET (ans)	48 $\pm$ 5	
Age Règles	Moyenne $\pm$ ET (ans)	13 $\pm$ 2	
Nb Grossesses	Moyenne $\pm$ ET	2,43 $\pm$ 2	
Nb Enfant	Moyenne $\pm$ ET	1,83 $\pm$ 1	
Age 1er Enfant	Moyenne $\pm$ ET (ans)	24 $\pm$ 10	
Durée CO	Moyenne $\pm$ ET (années)	14 $\pm$ 10	
Durée THS	Moyenne $\pm$ ET (années)	5 $\pm$ 28	
Durée THS + CO	Moyenne $\pm$ ET (années)	25 $\pm$ 38	

Le profil moléculaire en fonction de l'âge aux premières règles est rapporté dans la Figure 32 et la Figure 33. On observe que la fréquence de mutation EGFR est significativement plus élevée en cas de premières règles tardives (>14ans). De plus, la fréquence de mutation de BRAF semble significativement plus élevée lorsque la vie sexuelle (période entre les 1ères règles et la ménopause) est plus longue (13% vs 3% respectivement, p=0.04) (Figure 33). Les autres indicateurs liés à l'imprégnation hormonale (âge de la ménopause, âge au premier enfant, nombre de grossesse, nombre d'enfant, durée des traitements hormonaux) ou biomarqueurs ne présentent pas de différence cliniquement pertinente ou significative. En

analyse multivariée, seul l'âge au 1^{er} enfant est significativement associé au risque d'avoir une mutation EGFR même après ajustement l'âge au diagnostic, le tabagisme passif, l'IMC, l'âge à la ménopause, l'âge aux premières règles, le parité, le nombre de grossesse, les durées de traitements hormonaux, l'exposition à la pollution domestique, l'exposition professionnelle et les antécédents personnels et familiaux : AOR = 1,12 [IC95% 1,02 – 1,23] ; p=0,019. Aucune autre association significative n'a été retrouvée pour aucun autre facteur hormonal / reproductif ni aucun autre biomarqueur en analyse multivariée (deux modèles : simple ajusté sur l'âge et le sexe ; complexe : multi-ajusté sur les autres facteurs hormonaux et les autres facteurs de risque).

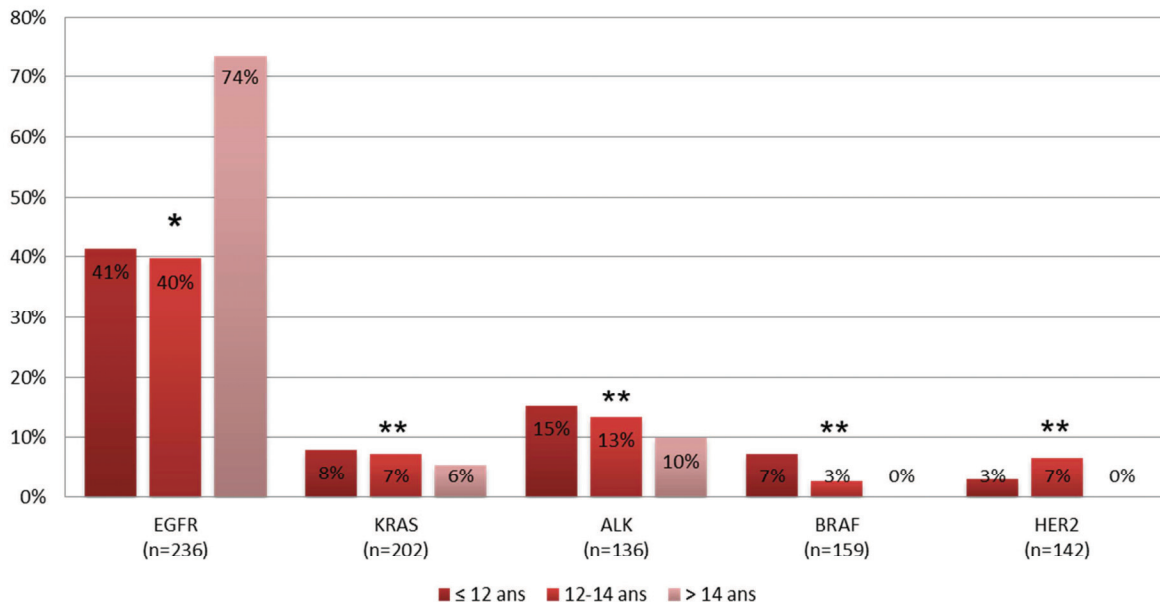


Figure 32 - Profil moléculaire en fonction de l'âge aux premières règles chez les femmes.

* p = 0,02 ; ** p = NS

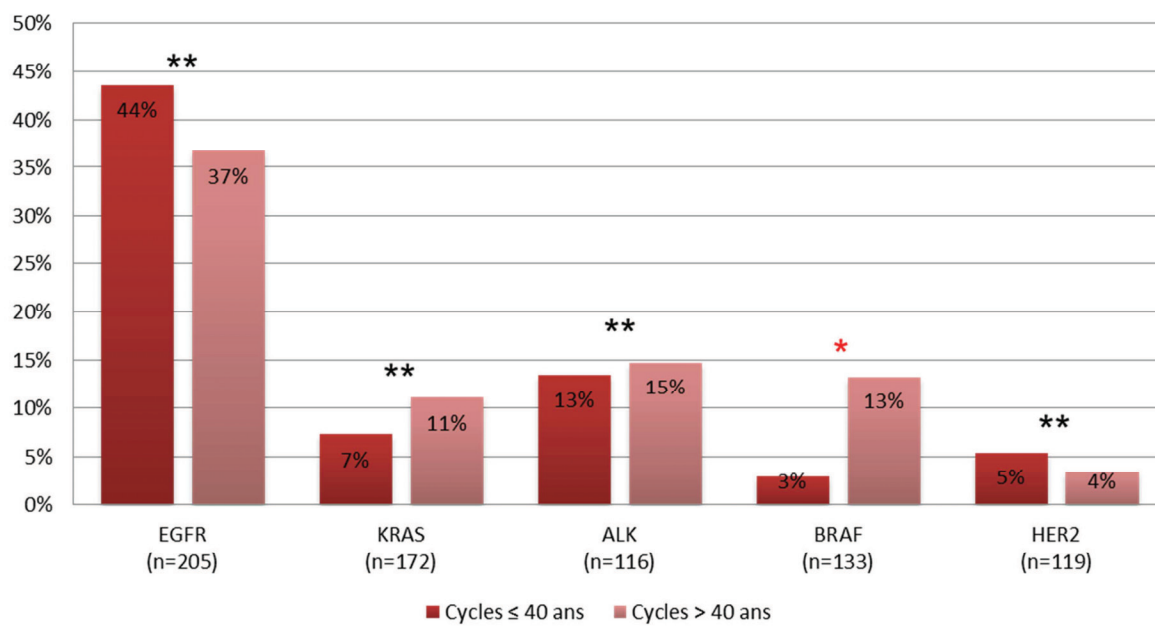


Figure 33 - Profil moléculaire en fonction de la durée de la vie sexuelle (âge de la ménopause - âge aux premières règles) chez les femmes

* p = 0,04 ; ** p = NS

X. DISCUSSION GENERALE SUR BIOCAST

L'étude BioCAST est une étude particulièrement originale par son ampleur et son exhaustivité. Certains points, discutés dans cette partie, affectent toutefois la valeur de ses résultats.

A. Absence de groupe témoin

BioCAST est un bio-observatoire descriptif. Il n'a pas été prévu de groupe témoin dans le protocole. Il aurait été particulièrement intéressant de tirer au sort, dans chacun des centres participants, plusieurs sujets fumeurs atteints de cancer bronchique, appariés sur le sexe et l'âge, aux sujets non-fumeurs déjà inclus dans BioCAST, afin de leur faire passer le même questionnaire. Cette méthodologie n'était toutefois pas possible pour des raisons financières.

Afin de mettre en perspective certains résultats, nous avons comparé certains résultats de l'étude BioCAST à ceux de deux enquêtes épidémiologiques menées en France, dans les mêmes centres que BioCAST, et à la même période. La première est l'étude décennale du Collège des Pneumologues des Hôpitaux Généraux menée sur tous les nouveaux cas de cancer bronchiques diagnostiqués en 2010 dans leur réseau. Une analyse en fonction du statut tabagique a été menée et il a donc été possible de comparer certaines données de BioCAST aux observations faites dans les 6246 fumeurs de l'étude KBP-CPHG 2010 (5,56). La seconde étude est une étude descriptive de l'épidémiologie moléculaire des cancers broncho-pulmonaires diagnostiqués en 2011 en France sur l'une des 28 plateformes de l'INCa. Ici aussi, une analyse a été menée en fonction du statut tabagique et les résultats de BioCAST peuvent être comparés aux 7789 patients fumeurs de cette étude (14).

Néanmoins, dans les deux cas, les études servant de référence ne disposent pas de données aussi détaillées que celles fournies par l'étude BioCAST. En outre, il n'existe aucune donnée comparable dans la littérature sur l'exposition aux facteurs de risque en France (voir même en Europe).

B. Contrôle des biais

La particularité de BioCAST est que le recueil des données cliniques a été réalisé lors d'un entretien téléphonique entre le patient et un professionnel de santé dédié. Les biais de remplissage et de classement sont ainsi diminués par le fait que l'ensemble des questionnaires est rempli par une seule et même personne. Le biais de mémoire a été maîtrisé grâce à la possibilité de préparation du questionnaire par le patient en amont, la programmation de l'entretien sur une durée longue, le fait que quelques questions étaient contrôlées par une reprise dans le questionnaire « médecin », et la possibilité de rappeler le patient pour des informations manquantes le cas échéant.

BioCAST est toutefois forcément soumise au biais de sélection des patients inclus, bien que le protocole insiste fortement sur la nécessité d'inclusion systématique de tous les nouveaux cas de CBNF diagnostiqués dans le centre.

Il faut également noter que la totalité des expositions aux facteurs de risque était déclarative par le patient (dans certains cas contrôlé par le médecin référent comme pour les antécédents). Pour des raisons financières et logistiques, ces expositions ne pouvaient être contrôlées par des mesures biologiques (lorsqu'elles existent).

Par contre, BioCAST peut se prévaloir d'une grande homogénéité dans sa population. Nous avons en effet pris toutes les mesures possibles pour n'inclure que des individus strictement non-fumeur au sens de la définition. À cet effet, les patients étaient scrupuleusement réinterrogés lors de la rédaction du questionnaire.

C. Faibles inclusions

Par rapport aux prévisions, BioCAST a inclus moins de patient que prévu (voir page 62). Ceci peut probablement s'expliquer par deux hypothèses. En premier lieu, il semble que le CBNF soit une entité peu fréquente en France. L'étude BioCAST a en effet contribué très largement à populariser la définition très stricte du non-fumeur (moins de 100 cigarettes dans la vie) et il est très probable que beaucoup de « petits-fumeurs » étaient jusque-là classés dans les « non-fumeurs », contribuant ainsi à augmenter artificiellement la proportion estimée de CBNF. En second lieu, les ouvertures des centres participants ont été particulièrement longues et étalées sur la période de l'étude. Ainsi les premiers centres ouverts ont bénéficiés de près de 15 mois pour inclure leur malades, tandis que les derniers n'avaient que quelques mois (voir la Figure 13, page 20).

D. Petits effectifs

L'effectif global inclus dans BioCAST est très important (384 CBNF avec une analyse très détaillée de leurs caractéristiques cliniques, moléculaires et de l'exposition aux facteurs de risque) et fait de cette série, la plus importante et la plus détaillée jamais menée dans une population caucasienne. Toutefois, l'analyse en sous-groupe amène bien souvent à traiter avec de très petits effectifs, ce qui affecte grandement la valeur des tests statistiques. Ainsi, à part l'EGFR, la plupart des analyses sur les biomarqueurs portent sur de très petits groupes. Ainsi, par exemple, BioCAST ne comprend « que » 24 réarrangements ALK, ou 10 mutations de BRAF. De même pour les expositions aux facteurs de risque qui – à l'exception du tabagisme passif – ne concernent que de très petits effectifs. À titre d'exemple, 8 patients seulement ont une exposition professionnelle certaine ou possible au diesel. Ces très petits effectifs ne permettent pas l'utilisation des techniques d'analyse multi variée quand ce n'est pas la validité même des analyses uni-variées. C'est la raison pour laquelle certains résultats sont présentés avec plusieurs modèles d'ajustement. Certains modèles incluent de nombreuses variables pour les grands groupes, quand d'autres ne prennent en compte qu'un nombre limité de facteurs d'ajustement (âge et sexe le plus souvent). Ainsi, les données concernant les grands groupes comme ceux présentant une mutation de l'EGFR (n=153) ou ceux exposés au tabagisme passif (n=219) peuvent avoir une signification. Pour les autres groupes de plus petit effectif, BioCAST peut être perçu comme une étude exploratoire pilote de chacun de ces groupes, nécessitant une validation spécifique sur de plus grands effectifs.

E. Expositions cumulées

Une autre difficulté est représentée par le fait qu'un individu donné peut être exposé à plusieurs facteurs de risque au cours de sa vie. Ceci est particulièrement bien illustré par la Figure 28 page 141, montrant les co-expositions des travailleurs à plusieurs carcinogènes professionnels. Il est en outre bien démontré que les facteurs de risque peuvent être synergiques dans certains cas. Il aurait été possible de

s'affranchir partiellement de cela grâce au choix des variables d'ajustement dans les modèles multivariés. Malheureusement, nous venons de voir ci-dessus que, bien souvent, les petits effectifs des groupes considérés n'autorisaient pas de telles analyses.

F. BioCAST : reflet d'une société passée

La cohorte BioCAST est une cohorte âgée (âge médian à l'inclusion de 71 ans). Ainsi, et comme bien souvent en épidémiologie, certaines différences mises en évidence n'ont pas d'explication « biologique » mais sociologique et reflète les habitudes passées de la société. La différence d'exposition au tabagisme passif en est une illustration. On sait en effet qu'il existait une différence de prévalence entre hommes et femmes et que celle-ci s'est comblée ces dernières décennies²⁵. Il ne faudrait donc pas conclure des résultats de BioCAST que les femmes ont une plus grande susceptibilité oncogénique au tabagisme passif mais bien que le tabagisme actif était plus fréquent chez les hommes, plus rare chez les femmes, et que le tabagisme passif de l'épouse était sociologiquement déterminé par le tabagisme actif de l'époux.

G. Manque d'exhaustivité des biomarqueurs

Depuis la mise en place de l'étude BioCAST, l'intérêt particulier de la communauté scientifique pour les CBNF a permis de retrouver d'autres biomarqueurs particulièrement fréquents chez les non-fumeurs. C'est le cas par exemple de ROS1 (environ 6% des non-fumeurs) ou de RET (25,26). Ces biomarqueurs n'étaient toutefois pas réalisés en routine sur les plateformes à l'époque des inclusions. Il faut toutefois avoir à l'esprit de « rajouter » ces deux biomarqueurs à la proportion déjà élevée (72%) de CBNF présentant une altération moléculaire. Une recherche de ROS1 puis de RET pourrait même être indiquée chez un patient non-fumeur si toutes les autres recherches s'avéraient négatives, d'autant qu'il existe des opportunités thérapeutiques efficaces (57).

H. Études et données comparables

En France, l'équipe de Nancy avait déjà montré, sur 67 patients atteints de CBNF que l'exposition au tabagisme passif et à la pollution professionnelle étaient distribués différemment selon le sexe (58). Notre étude reste toutefois l'une des plus importantes dans la littérature sur ce sujet. A titre d'exemple, la grande cohorte européenne EPIC²⁶ ne comporte « que » 97 nouveaux cas de cancer bronchique (59). De même, en Asie, Kim et al. a récemment rapporté la plus importante étude rétrospective sur les non-fumeurs et celle-ci comprenait « que » 229 cas (60). Enfin, le fait que 72% des cas de CBNF en France présente une anomalie moléculaire identifiable, nous place entre l'Asie (plus de 80% des cas) et les États-Unis (55% des cas) (1,2,61).

L'association entre exposition au tabagisme passif et mutation EGFR a déjà été explorée par plusieurs équipes, avec des résultats hétérogènes. Ainsi, Lee *et al.* a retrouvé une relation inverse entre l'exposition au tabagisme passif et la fréquence de mutation EGFR en analyse multivariée ajustée sur l'âge et le sexe en Asie (62). Ces données sont d'ailleurs tout à fait convergent avec les résultats de Tam *et al.*, bien qu'obtenu de manière uni-variée et non significatif (63). Étonnement, une autre équipe asiatique a

²⁵ Institut National de Prévention et d'Éducation en Santé. Baromètre santé 2010. Prévalence du tabagisme en France. Disponible sur : <http://www.inpes.sante.fr/Barometres/barometre-sante-2010/pdf/prevalence-tabagisme.pdf> [Accédé le 20/10/2014]

²⁶ European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition

retrouvé une association inverse à deux reprises sur une large cohorte de plus de 400 LCINS et avec un modèle d'analyse multi-varié multi-ajusté (64,65). Pour terminer, Taga *et al.* a étudié ce point sur deux cohortes américaines différentes. Les résultats étaient opposés dans les deux cohortes (66). Ces résultats particulièrement discordants peuvent s'expliquer par la difficulté à quantifier de manière précise l'exposition au tabagisme passif (67). Dans tous les articles mentionnés ci-dessus, l'évaluation était faite par questionnaire verbal auprès du patient. Ceci est donc particulièrement soumis aux biais de rédaction et de mémorisation. L'évaluation à l'aide de marqueur biologique (comme les cotinines urinaires) pourrait être utile mais elle ne renseigne que sur les expositions récentes (59). Ainsi l'évaluation en paquet-année-passif ou fumeur-année-passif est bien souvent biaisée. Hors la plupart des publications s'appuient sur cette quantification afin de tenter de mettre en évidence une relation effet-dose. Enfin, il existe probablement une susceptibilité génétique, pour le moment encore inconnue, pour expliquer les différences observées selon les origines ethniques (2,68).

A l'exception d'EGFR, les relations entre exposition aux facteurs de risque et les autres biomarqueurs n'ont que très peu été étudié. Une étude a rapportée l'absence de différence dans la fréquence des mutations KRAS chez des patients atteints de LCINS qu'ils soient exposé ou non au tabagisme passif ; tandis que deux petites études rétrospectives ne retrouvaient pas non plus de différence dans la fréquence des anomalies de ALK (63,65,69). De même, à part l'exposition au tabagisme, seule l'exposition au Radon a également été étudiée en lien avec la fréquence de mutation EGFR, sans différence notable observée (66).

XI. INTERETS DE L'ADN CIRCULANT EN ONCOLOGIE THORACIQUE

A. Biologie de l'ADN circulant

L'ADN circulant (ADNc) correspond à des fragments d'ADN, passés dans le secteur extracellulaire et détectables dans le plasma. La présence d'ADN circulant n'est pas l'apanage des patients atteints de cancer puisqu'on peut détecter des fragments circulant d'acides nucléiques dans le plasma des sujets sains, chez les femmes enceintes mais également chez des patients porteurs de pathologies bénignes, traumatiques ou inflammatoires (31). Cet ADN provient alors des cellules sanguines normales, du fœtus, des micro-organismes infectieux ou des cellules tumorales (issues de la tumeur primitive ou de ses métastases ou encore des cellules tumorales circulantes).

Habituellement, l'ADNc prend la forme d'un acide nucléique double brin dont le poids moléculaire peut varier de 0,15 kiloBases à plus de 20 kiloBases (Figure 34).

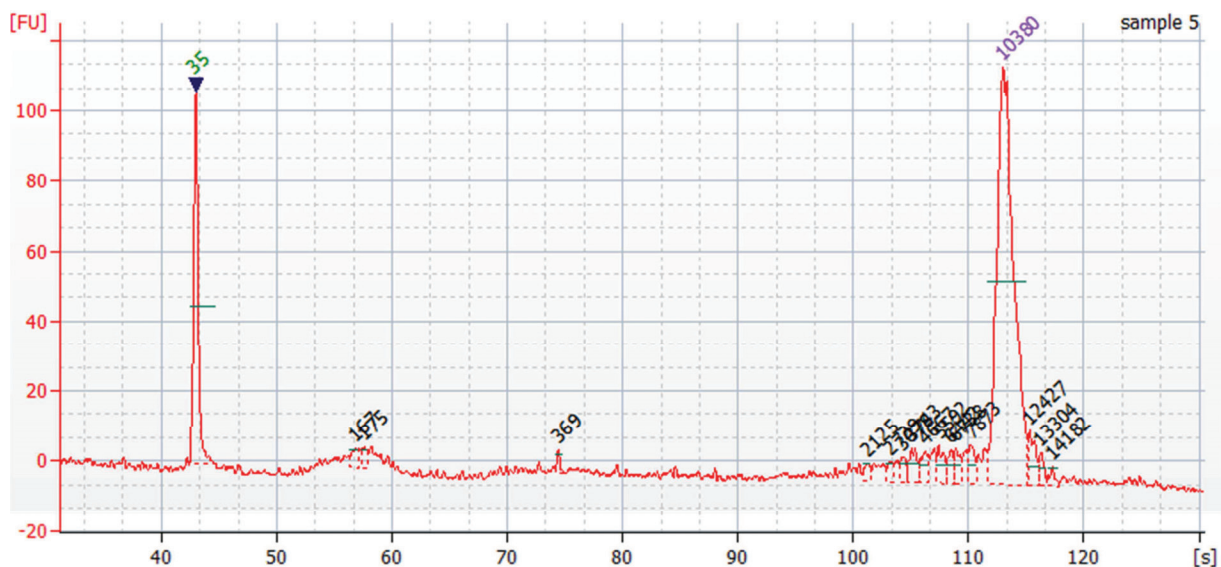


Figure 34 - Répartition de la taille des fragments d'ADN caractérisés dans le plasma d'un individu. Les fragments 35 et 10380 sont les références. Quinze fragments ont été mis en évidence dans ce prélèvement: taille moyenne 5574pb; min 167pb; max 14182pb.

L'ensemble des mécanismes aboutissant à la présence de l'ADNc dans le sang reste partiellement connu. Chez les sujets sains, il serait la conséquence de phénomènes d'apoptose et non de nécrose et il proviendrait ainsi principalement des cellules hématopoïétiques (70). Bien que cela reste débattu, il semble que l'ADNc soit aussi en partie activement sécrété par les cellules normales. Chez les patients porteurs de cancer, en plus de la libération active par les cellules cancéreuses, la présence d'ADNc dans le plasma est la conséquence de phénomènes d'apoptose et de nécrose des cellules tumorales. L'ADNc peut alors se complexer à certaines glycoprotéines sanguines et agir dans la signalisation cellulaire. Il est donc principalement présent dans le plasma sous cette forme de complexe nucléoprotéique qui aurait pour effet essentiel de protéger l'ADNc de l'effet des nucléases plasmatiques (70–72).

Les processus d'élimination de l'ADNc sont très peu connus. L'ADN libre fœtal circulant dans le sang maternel (présent dès le premier trimestre de grossesse) a une demi-vie comprise entre 4 et 30 minutes après la délivrance. L'élimination de l'ADNc serait divisée entre une première phase rapide hépatique et une seconde phase rénale plus lente (73).

B. Méthodes d'analyse de l'ADNc

Différents facteurs peuvent interférer dans l'analyse de l'ADNc. Les concentrations d'ADNc sont plus importantes dans le sérum que dans le plasma, probablement en raison de la lyse leucocytaire pendant la coagulation. Pour limiter la contamination par cet ADN constitutionnel, les prélèvements à base de plasma sont recommandées pour l'analyse de l'ADNc en oncologie (74). Ainsi, Vallée *et al.* ont montré que la recherche de mutations EGFR dans l'ADNc était plus performante dans le plasma que dans le sérum car la proportion d'ADN tumoral y est plus importante (75). Par ailleurs, le type d'anticoagulant utilisé pour la collecte du plasma, le délai entre le prélèvement et la centrifugation, les modalités de centrifugation et de conservation influencent l'analyse de l'ADNc (76,77). De même, plus le délai entre le prélèvement et l'isolement du plasma est grand, plus la contamination par l'ADN génomique des cellules nucléées sanguines cette contamination est importante. Un isolement rapide après le prélèvement (moins de 4h idéalement) suivi d'une conservation à -20°C ou moins est donc primordial (74). Le type de méthode utilisé pour l'extraction de l'ADNc a également son importance. Une des méthodes de référence est l'extraction par phénol/chloroforme mais elle nécessite l'utilisation de solvants organiques et de réalisation longue. Les kits commerciaux comme le kit QiaAmp Blood® (Qiagen, Venlo, Pays-Bas) sont performants, plus rapides et permettent de s'affranchir de l'utilisation de solvants organiques (76).

Il n'y a pas de standard concernant les méthodes de quantification de l'ADN. Dans le passé, les méthodes de quantification utilisaient des techniques fluorométriques ou colorimétriques qui manquaient de spécificité. D'autres méthodes de quantification ont été développées comme des techniques de dosage radio-immunologique par compétition, ou de radiomarquage par translation de coupure ayant une sensibilité de l'ordre du nanogramme. Mais la méthode la plus simple et performante actuellement reste la technique Quant IT Pico-green® (Life Technology, Carlsbad, CA, États-Unis) ayant permis d'abaisser le seuil de quantification à l'ordre du picogramme. Enfin, les méthodes de PCR quantitatives peuvent être utilisées sous réserves d'utiliser des amorces les plus petites possibles afin de permettre l'amplification de fragments d'ADNc les plus courts possibles. Les méthodes utilisées sont souvent différentes selon les équipes, ce qui rend la comparaison des résultats difficile (76).

C. ADN circulant et cancers

La concentration d'ADNc est significativement plus élevée chez les patients atteints de cancer comparativement à celle mesurée chez les sujets sains, comme cela a notamment été démontré dans les cancers du sein, les cancers colorectaux, ou les cancers de l'ovaire (78). Par exemple, Fleischhacker et Schmidt ont montré que la concentration plasmatique d'ADNc variait de 122 à 462 ng/mL chez les patientes porteuses de cancer mammaire versus 3 à 63 ng/mL chez des sujets sains (79). Ces concentrations sont également plus élevées chez les patientes porteuses de lésions cancéreuses mammaires, par rapport à celles porteuses de lésions mammaires bénignes (80).

Il a été montré que le taux d'ADNc était associé à la taille tumorale, à l'envahissement ganglionnaire, ou au stade tumoral dans le cancer du sein. Des résultats similaires ont été retrouvés dans le cancer colorectal, le cancer de la prostate ou le cancer ovarien. Par exemple, Zhong *et al* ont montré que les taux moyens d'ADNc chez les patientes ayant une tumeur primitive supérieure à 2 cm étaient supérieurs à celles dont la tumeur mesurait moins de 2 cm. Les mêmes auteurs ont montré que le taux d'ADNc était plus important lorsque les ganglions étaient envahis (81).

L'ADNc a également démontré son intérêt dans le suivi de la maladie. Les concentrations d'ADNc sont en effet significativement plus élevées avant comparées à après une chirurgie de résection tumorale dans les cancers colorectaux, du sein, de l'œsophage, du rein ou du poumon (82). Plus récemment, il a été montré dans le cancer du sein que la concentration d'ADNc pouvait être utilisée comme facteur prédictif de la réponse à la chimiothérapie dans les cancers du sein (83). L'ADNc semble également avoir une valeur pronostique. Par exemple, dans le cancer de l'ovaire, Kamat *et al* ont montré qu'une concentration élevée initialement était un facteur de mauvais pronostic en termes de survie globale (84).

L'étude de l'ADNc pourrait également avoir un intérêt pour le diagnostic non invasif des anomalies somatiques tumorales. De nombreuses études ont montré une corrélation entre les altérations moléculaires tumorales et la présence de ces altérations au sein de l'ADNc telles que les mutations de TP53 et KRAS, ou la méthylation de certains gènes suppresseurs de tumeurs (78). Wang *et al* ont par exemple montré, chez des patients porteurs de cancer colorectal que les mutations des gènes APC²⁷, TP53 et KRAS détectées dans le tissu tumoral pouvaient également l'être dans l'ADNc (85). Pinzani *et al* ont montré une concordance de 80% entre la présence d'une mutation BRAF dans l'ADNc et dans le tissu tumoral chez des patients porteurs de mélanome métastatique (86). L'ADNc est donc l'un des supports des biopsies liquides qui permettent le diagnostic non-invasif du profil moléculaire somatique.

D. ADN circulant et cancer broncho-pulmonaire

Plusieurs équipes ont montré que les concentrations d'ADNc étaient plus élevées chez les patients atteints de cancer broncho-pulmonaire comparés aux sujets sains. Il faut toutefois rappeler que l'augmentation de l'ADNc n'est pas spécifique du cancer du poumon. D'autres conditions pathologiques respiratoires induisent une élévation de la concentration en ADNc comme la fibrose pulmonaire idiopathique ou les syndromes d'apnées du sommeil (87).

1. Facteur prédictif de réponse au traitement

La concentration d'ADNc est un reflet de la masse tumorale (88,89). Il est donc naturel de suggérer que l'évolution de la concentration en ADNc puisse être un facteur prédictif de réponse au traitement. Si l'on considère la concentration globale en ADNc, les données de la littérature sont contradictoires sur ce sujet. Ainsi, la concentration résiduelle en ADNc est associée à la réponse au traitement chirurgical (90).

Gautshi *et al.* ont étudié l'évolution de la concentration en ADNc dans le sérum et dans le plasma, avant et après chimiothérapie chez 91 patients atteints de CBNPC de stade IV traités par 1 à 3 cycles de chimiothérapie à base de carboplatine et de taxanes. Les patients étaient répartis en 3 groupes :

²⁷ Anaphase Promoting Complex

répondeurs, stables ou progressifs. Chez les patients stables ou répondeurs les concentrations d'ADNc dans le sérum étaient significativement diminuées mais pas de le plasma. Inversement, chez les patients progressifs, une augmentation des taux d'ADNc était observée dans le plasma mais pas dans le sérum (88). Cette discordance entre les observations faites dans le plasma et dans le sérum n'était pas bien expliquée par les auteurs. Ces derniers concluaient que la concentration d'ADNc n'était pas un biomarqueur prédictif fiable. Lee *et al.* ont étudié l'évolution de la concentration d'ADNc chez 108 non-fumeurs porteurs d'adénocarcinomes pulmonaire avant et après 3 cycles de chimiothérapie par cisplatine et gemcitabine ou d'un traitement par gefitinib. Les patients étaient divisés en tertiles en fonction de leurs concentrations initiales en ADNc. Dans le tertile de basse concentration initiale d'ADNc, la concentration augmentait après traitement, indépendamment et quelle que soit la réponse tumorale. Dans ce groupe, l'augmentation de la concentration d'ADNc était plus importante chez les patients progressant sous chimiothérapie (augmentation de 20,5%) que chez les patients stables (augmentation de 10,9%). Dans le groupe taux d'ADNc initial moyen il n'y avait aucune différence significative dans les concentrations, tandis que dans le tertile haut, on observait une diminution de la concentration en ADNc après traitement et quelle que soit la réponse au traitement (91). Enfin, Kumar *et al.* ont étudié la concentration d'ADNc chez 42 patients porteurs d'un CBNPC avant et après trois cycles de chimiothérapie. Ils ont montrés que lorsque les patients étaient répondeurs la concentration diminuait significativement ; en revanche, chez les patients progressifs, ces taux augmentaient (92). Ces données sont donc contradictoires et souvent affectées par la taille de l'effectif d'une part et par le manque de qualité des échantillons d'autres part. Des données s'appuyant sur des collections de grand effectif et des échantillons collectés selon les standards sont attendues pour clarifier le rôle prédictif de la concentration totale en ADNc dans les CBP.

Un autre aspect peut être particulièrement intéressant pour évaluer l'efficacité d'un traitement. Il s'agit de suivre la concentration de la fraction mutée (et non la concentration totale) d'un biomarqueur donné. Marcq *et al* rapportent par exemple deux exemples éloquentes (93). Ainsi, la diminution (voire la disparition) d'une mutation activatrice de l'EGFR dans le plasma est un facteur prédictif de réponse à un traitement par TKI. Inversement, la ré-apparition de cette mutation et/ou l'émergence d'une mutation T790M de l'EGFR, est un facteur prédictif de progression. Cette approche s'avère très prometteuse et devrait rapidement être disponible en routine (94).

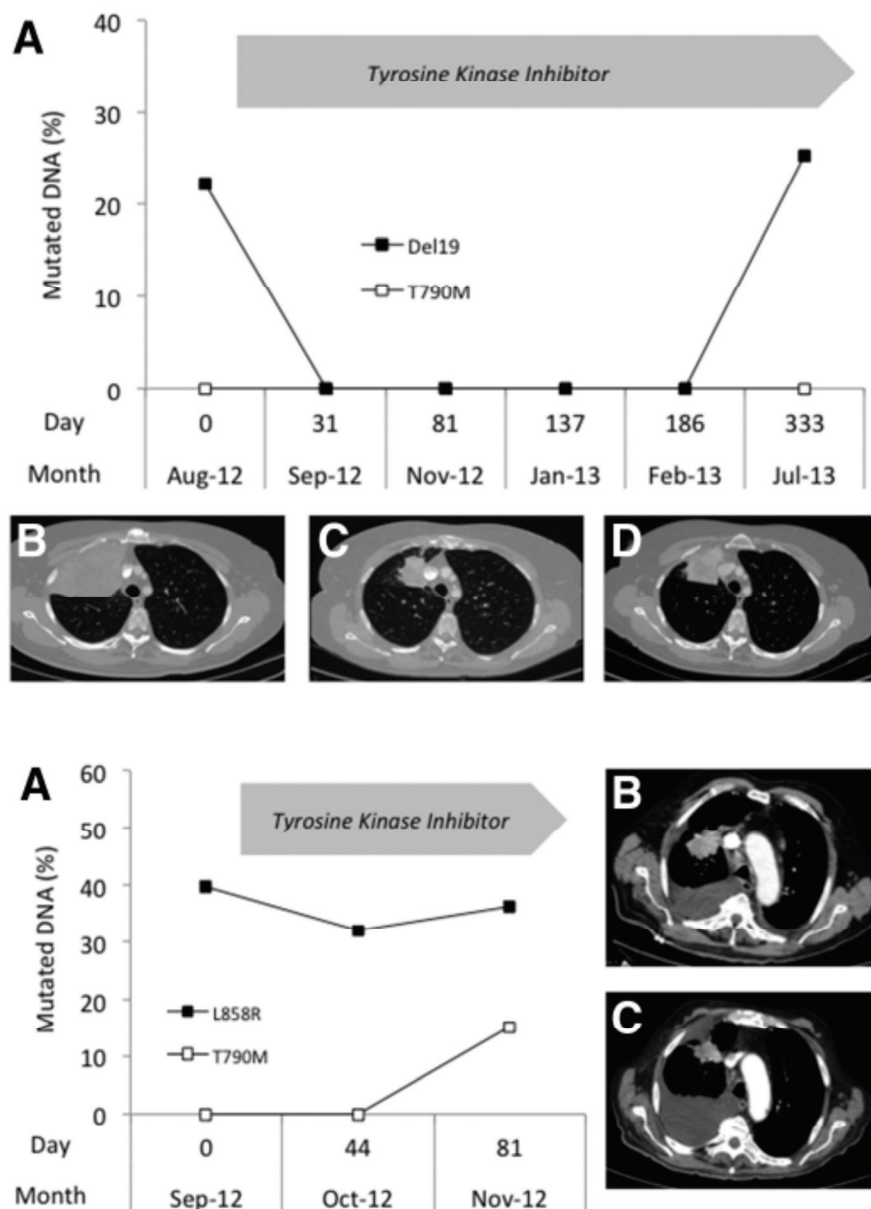


Figure 35 - Évolution des fractions mutées EGFR au cours d'un traitement par ITK et corrélation avec la progression RECIST chez des patients (extrait de la référence (93))

2. Facteur pronostic

Plusieurs études ont par contre démontrées l'intérêt de l'ADNc en tant que facteur pronostic dans le CBNPC. Par exemple Lee *et al* ont montré une association entre la concentration initiale en ADNc et la survie globale. Le Hazard ratio pour la survie globale dans le tertile « haute concentration » par rapport au tertile « basse concentration » était de 2,7 (IC 95% 1,16-4,91). Autrement dit, la survie globale était de 16,8 mois dans le tertile « haute concentration » contre 28,6 mois dans le tertile « basse concentration » initiale d'ADNc (91). Cette association a d'ailleurs été retrouvée dans d'autres travaux (88,95–97). Une concentration élevée d'ADNc avant traitement serait donc un marqueur indépendant de mauvais pronostic dans le CBNPC.

3. Outil pour le diagnostic non-invasif

Plusieurs auteurs se sont intéressés au diagnostic des mutations somatiques à partir de l'ADNc. Il a ainsi été d'abord démontré que les mutations de l'EGFR au sein du tissu tumoral et celles retrouvées dans l'ADNc étaient identiques ; puis que la présence d'une mutation EGFR dans le plasma était prédictif de réponse à un traitement par gefitinib (98). Plusieurs autres études ont étudiées la performance de la détection de mutation EGFR dans l'ADNc avec une spécificité toujours correcte et une sensibilité variable (**Tableau 10** - Principaux résultats des études s'étant intéressée au diagnostic non invasif de biomarqueur dans le CBNPCTableau 10). Très peu de données concernent toutefois d'autres biomarqueurs qu'EGFR. Ces études portent en outre généralement sur de petits effectifs.

Tableau 10 - Principaux résultats des études s'étant intéressée au diagnostic non invasif de biomarqueur dans le CBNPC (d'après référence (89))

Référence	Comparaison avec l'ADN tissulaire	Biomarqueur testé	Stade	N mute (tissu)	Sensibilité	Spécificité	Concordance
Kimura H, 2007	O	EGFR	IV	8	75%	97%	93%
Rosell R, 2009	O	EGFR	IV	164	59%	NC*	59%
Kuang, 2009	O	EGFR T790M	IIIB / IV	30	70%	85%	74%
Wang, 2010	O	KRAS	IIIB / IV	30	77%	95%	93%
Taniguchi, 2011	O	EGFR	IV	44	72%	NC*	73%
Jian G, 2010	N	EGFR	IIIB / IV	22	-	-	
Nakamura, 2011	N	EGFR T790M	IIIB / IV	-	-	-	
Goto, 2012	O	EGFR	IIIB / IV	51	43%	100%	66%
Yam I, 2012	O	EGFR	III / IV	32	100%	80%	97%
Narayan A, 2012	O	KRAS (EGFR, BRAF)	I-IV	6 (KRAS)	100%	100%	100%
Nygaard AD, 2013	O	KRAS	II to IV	10	90%	NC*	90%
Zhao X, 2013	O	EGFR (L858R et del19)	I to IV	45	36%	95%	71%
Sakai K, 2013	N	EGFR T790M	IV	21	-	-	
Mok T, 2013	O	EGFR (del19, L858R et G719X)	IIIB / IV	89	76%	96%	88%
Kim HR, 2013	O	EGFR (L858R et del19)	III / IV	6	55%	100%	88%
Douillard J-Y, 2014	O	EGFR (del19, L858R, T790M)	III/ IV	105	66%	100%	94%
Oxnard G R, 2014	O	EGFR L858R / EGFR del19 / KRAS G12C	-	12/9/14	67%/67%/71%	100%/100%/100%	83%/87%/87%
Groupe				614	67%	97%	86%

L'ADNc pourrait donc constituer un accès simple et non-invasif au génome tumoral et pourrait permettre d'éviter la réalisation de procédures invasives afin d'obtenir des (re-)biopsies tumorales.

**E. ARTICLE – REVUE de la littérature sur l'intérêt de l'ADN circulant en oncologie thoracique.
(Sollicitée par le comité de rédaction, Revue de Pneumologie Clinique, en révision).**

Tissot C, Villar S, Olivier M, Couraud S. Intérêts de l'ADN circulant pour la prise en charge du cancer broncho-pulmonaire. *Rev Pneumol Clin*. 2014 (en révision)

Manuscript Number: PNEUMO-D-14-00093

Title: Intérêts de l'ADN circulant pour la prise en charge du cancer broncho-pulmonaire Free circulating DNA as a tool for lung cancer patients management

Article Type: Revue generale

Keywords: Cancer broncho-pulmonaire; ADN circulant; biomarqueur; EGFR; pronostic; chimiothérapie lung cancer; free circulating DNA; biomarker; EGFR; prognosis; chemotherapy

Corresponding Author: Dr. Sébastien COURAUD, MD, MSc

Corresponding Author's Institution: Hospices Civils de Lyon - CH Lyon Sud

First Author: Claire Tissot, resident

Order of Authors: Claire Tissot, resident; Stéphanie Villar; Magali Olivier; Sébastien Couraud

Abstract: Résumé

L'existence de l'ADN libre circulant (ADNc) est connue depuis plusieurs décennies. Il s'agit de fragments d'ADN provenant de cellules nucléées et libérés dans la circulation par nécrose, apoptose et/ou sécrétion active. Ces fragments sont pour la grande majorité d'origine constitutionnelle (ADN des cellules nucléées sanguines) mais, chez les patients atteints de cancer, une fraction peut provenir des cellules tumorales.

Bien que mal connue dans le domaine de l'oncologie thoracique, l'analyse quantitative et qualitative de l'ADNc est pourtant d'un grand intérêt. La concentration totale en ADNc semble un facteur indépendant du pronostic de la maladie. L'ADNc est en effet le reflet de la masse tumorale d'une part et d'un processus métastatique d'autre part.

Si l'évolution de la concentration totale en ADNc semble assez peu intéressante pour évaluer l'efficacité d'une chimiothérapie, le suivi de la fraction mutée de gènes cibles tel EGFR sous traitement par inhibiteur des tyrosines kinases semble particulièrement prometteur pour détecter le plus précocement possible une progression.

L'utilisation de l'ADNc comme biopsie liquide semble également très prometteuse pour le diagnostic du profil moléculaire tumoral de manière non-invasive et son suivi évolutif.

L'ADNc est donc un outil multifonction prometteur en oncologie thoracique et sa translation dans la pratique devrait être rapide désormais.

Summary

The existence of free circulating DNA (cfDNA) has been known for several decades. These cfDNA fragments are released into the circulation from nucleated cells through necrosis, apoptosis and / or active secretion. These fragments are mainly from constitutional origin (nucleated blood cell DNA), but in patients with cancer, a fraction comes from tumor cells.

Although not well known in the field of thoracic oncology, quantitative and qualitative analysis of the cDNA is nevertheless of great interest.

Total cfDNA concentration appears an independent prognostic factor in lung cancer. cfDNA reflects in fact both the tumor mass and the metastatic process. Although changes in total cfDNA concentration is not informative to assess the effectiveness of chemotherapy, following-up the fraction of mutated

genes such as EGFR during therapy with tyrosine kinase inhibitors appears to be particularly promising for the early detection of disease progression. The use of cfDNA as liquid biopsy also appears very promising for the diagnosis, molecular profiling, and invasive monitoring of tumors. cfDNA is thus a promising versatile tool in thoracic oncology and its translation into practice should be happening soon.

Suggested Reviewers:

Opposed Reviewers:

Intérêts de l'ADN circulant pour la prise en charge du cancer broncho-pulmonaire.

Free circulating DNA as a tool for lung cancer patients management

Claire Tissot^{1,2}, Stéphanie Villar¹, Magali Olivier¹, Sébastien Couraud^{2,3}

1. Groupe Mécanismes moléculaires et biomarqueurs, Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC/IARC)Lyon, France

2. Service de Pneumologie Aiguë Spécialisée et Cancérologie Thoracique, CH Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon, 165 chemin du grand Revoyet, 69495 Pierre Bénite, France.

3. Faculté de médecine et de maïeutique Lyon Sud Charles Mérieux, Université Lyon 1, 165 chemin du petit Revoyet, 69600 Oullins, France.

Nombre de mots dans l'article : 2521

Nombre de mots dans le résumé : 202

Nombre de références : 58

Auteur Correspondant :

Sébastien Couraud

Service de Pneumologie Aiguë Spécialisée et Cancérologie Thoracique,

CH Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon,

165 chemin du grand Revoyet, 69495 Pierre Bénite, France

Tel 04 78 86 44 05 – Fax 04 78 86 44 19 – sebastien.couraud@chu-lyon.fr

RESUME

L'existence de l'ADN libre circulant (ADNc) est connue depuis plusieurs décennies. Il s'agit de fragments d'ADN provenant de cellules nucléées et libérés dans la circulation par nécrose, apoptose et/ou sécrétion active. Ces fragments sont pour la grande majorité d'origine constitutionnelle (ADN des cellules nucléées sanguines) mais, chez les patients atteints de cancer, une fraction peut provenir des cellules tumorales.

Bien que mal connue dans le domaine de l'oncologie thoracique, l'analyse quantitative et qualitative de l'ADNc est pourtant d'un grand intérêt. La concentration totale en ADNc semble un facteur indépendant du pronostic de la maladie. L'ADNc est en effet le reflet de la masse tumorale d'une part et d'un processus métastatique d'autre part.

Si l'évolution de la concentration totale en ADNc semble assez peu intéressante pour évaluer l'efficacité d'une chimiothérapie, le suivi de la fraction mutée de gènes cibles tel EGFR sous traitement par inhibiteur des tyrosines kinases semble particulièrement prometteur pour détecter le plus précocement possible une progression.

L'utilisation de l'ADNc comme biopsie liquide semble également très prometteuse pour le diagnostic du profil moléculaire tumoral de manière non-invasive et son suivi évolutif.

L'ADNc est donc un outil multifonction prometteur en oncologie thoracique et sa translation dans la pratique devrait être rapide désormais.

Mots clés : Cancer broncho-pulmonaire, ADN circulant, biomarqueur, EGFR, pronostic, chimiothérapie

ABSTRACT

The existence of free circulating DNA (cfDNA) has been known for several decades. These cfDNA fragments are released into the circulation from nucleated cells through necrosis, apoptosis and / or active secretion. These fragments are mainly from constitutional origin (nucleated blood cell DNA), but in patients with cancer, a fraction comes from tumor cells.

Although not well known in the field of thoracic oncology, quantitative and qualitative analysis of the cDNA is nevertheless of great interest.

Total cfDNA concentration appears an independent prognostic factor in lung cancer. cfDNA reflects in fact both the tumor mass and the metastatic process. Although changes in total cfDNA concentration is not informative to assess the effectiveness of chemotherapy, following-up the fraction of mutated genes such as EGFR during therapy with tyrosine kinase inhibitors appears to be particularly promising for the early detection of disease progression.

The use of cfDNA as liquid biopsy also appears very promising for the diagnosis, molecular profiling, and invasive monitoring of tumors.

cfDNA is thus a promising versatile tool in thoracic oncology and its translation into practice should be happening soon.

Key words: lung cancer, free circulating DNA, biomarker, EGFR, prognosis, chemotherapy

INTRODUCTION

La présence d'ADN libre circulant (ADNc) dans le sang est connue depuis plusieurs décennies mais ce n'est que récemment qu'un regain d'intérêt s'est manifesté pour ce biomarqueur potentiel [1,2]. L'ADNc est constitué de fragments d'acides nucléiques doubles brins, dont le poids moléculaire peut varier de 0.18 à 21 Kb. Il est issu de cellules nucléées et est largué dans la circulation par nécrose, apoptose et/ou sécrétion active. Il est détectable dans le plasma ou le sérum [3,4].

L'ADNc est constitué de fragments provenant de diverses origines: il contient de l'ADN issu de cellules normales de l'organisme comme par exemple les cellules nucléées sanguines ; l'ADN peut être d'origine microbienne ou virale en cas d'infection ; chez la femme enceinte, l'ADN peut être d'origine fœtale ; enfin l'ADN peut être d'origine tumorale chez les personnes atteintes de cancer. Les concentrations d'ADNc peuvent être élevées dans des conditions physiopathologiques telles que l'inflammation, les traumatismes tissulaires ou encore certaines tumeurs bénignes [2,5].

L'ensemble des mécanismes aboutissant à la présence de l'ADNc dans le sang reste mal connu. Chez les sujets sains, il serait essentiellement la conséquence de phénomènes d'apoptose (et non de nécrose) et il proviendrait ainsi principalement des cellules hématopoïétiques [6]. L'ADNc semble aussi en parti sécrété activement par des cellules normales comme les lymphocytes, ainsi que par les cellules tumorales. Chez les patients atteints de cancer, l'ADNc est également la conséquence de phénomènes de nécrose. Pour terminer, en cas de pathologie cancéreuse, l'ADNc peut également provenir de la lyse des Cellules Tumorales Circulantes (CTC), ces cellules tumorales impliquées dans le processus métastatique circulant librement dans le sang et également identifiées comme étant un biomarqueur prometteur en oncologie. Aussi, chez ces patients, une petite partie de l'ADNc proviendrait de la lyse de cellules tumorales circulantes s'étant détachées de la tumeur primitive et étant impliquées dans le processus métastatique [5,6].

L'ADNc peut se complexer à certaines glycoprotéines sanguines et agir dans la signalisation cellulaire. L'ADNc est en effet présent principalement dans le plasma sous forme de complexes nucléoprotéiques qui jouerait un rôle protecteur de l'ADNc contre les nucléases plasmatiques ralentissant ainsi sa dégradation [6]. Les processus d'élimination de l'ADNc sont très peu connus. Les seules données similaires disponibles concernent l'ADNc fœtal dont la demi-vie après l'accouchement serait très courte (entre 4 et 30 minutes après la délivrance). Cette élimination serait divisée entre une première phase rapide hépatique, suivie d'une seconde plus lente rénale [7,8].

Bien que mal connue dans le domaine de l'oncologie thoracique, l'étude de l'ADNc est pourtant d'un grand intérêt en oncologie [2]. Cette revue a pour objectif de décrire les connaissances et applications de l'utilisation de l'ADNc en oncologie et plus particulièrement dans le CBNPC.

L'ADNC : UN OUTIL POUR LE DIAGNOSTIC PRÉCOCE ?

Les concentrations d'ADNc sont plus élevées chez les patients atteints de cancer broncho-pulmonaire comparés aux sujets sains [2]. Cette constatation a permis d'évoquer logiquement l'hypothèse que la concentration totale en ADN circulant pouvait être un biomarqueur du diagnostic précoce de CBNPC, seul ou en association à d'autres examens. Selon les études, la spécificité pour le diagnostic positif de CBP varie de 47 à 100% tandis que la sensibilité varie de 52 à 91% [9-17]. Ces études sont toutefois assez hétérogènes, particulièrement en ce qui concerne le seuil utilisé pour définir un test positif (cf. Tableau I). Ceci témoigne de la difficulté de standardisation et de reproductibilité de la mesure de la concentration totale en ADN circulant. Par ailleurs, les effectifs de ces études sont limités. En outre, dans certaines de ces études, les sujets inclus n'étaient pas appariés sur l'âge et le sexe et les critères d'inclusion des sujets contrôles étaient parfois mal précisés. La difficulté réside ici dans le fait que tout l'ADN circulant ne provient pas de la tumeur. En réalité, seule une faible fraction en est issue et il n'est pas possible de la caractériser (hormis en cas de mutation somatique) [7,18]. Les causes de faux-positifs sont nombreuses puisque l'augmentation de la concentration d'ADNc n'est pas spécifique du cancer du poumon. L'ADNc est en effet également augmenté dans d'autres pathologies pulmonaires comme par exemple la fibrose pulmonaire idiopathique voire même dans les syndromes d'apnée-hypopnée du sommeil [19,20].

Globalement, il semble donc que la mesure de la concentration d'ADNc total soit de faible intérêt pour le diagnostic précoce de CBP. Par contre, de nombreuses pistes prometteuses existent bien. Ainsi, Certains auteurs se sont intéressés à l'intérêt diagnostique de l'analyse de la méthylation de certains gènes à partir de l'ADNc. Zhang *et al* ont ainsi montré que la méthylation d'un panel de gènes (APC, RASSF1A, CDH13, KLK10 et DLEC1) permettait de différencier les patients porteurs d'un cancer pulmonaire des patients sains, avec une sensibilité de 83.6% et une spécificité de 74% [21]. D'autres auteurs ont montrés que la performance diagnostique de la méthylation du gène p16/INK4A pouvait être intéressante [22]. Enfin, les micro-ARN, des acides nucléiques simples brins circulant également dans le plasma, pourraient être très prometteurs dans cette indication [23,24].

L'ADNC COMME FACTEUR PRÉDICTIF DE LA RÉPONSE AU TRAITEMENT

Plusieurs études ont démontrées que la concentration totale en ADNc était significativement associée au stade et à la masse tumorale tumorale [11,25,26] Par conséquent, il est logique de poser l'hypothèse que la concentration d'ADNc pourrait être un biomarqueur prédictif de la réponse au traitement dans les maladies néoplasiques.

Des expérimentations menées sur des modèles animaux ont montré que la diminution des taux d'ADNc était associée à une régression tumorale et donc à la réponse au traitement [27].

Comme dans d'autres cancers, dans le CBP, les concentrations d'ADNc semblent être associées à la réponse au traitement chirurgical. Il a ainsi été montré que des taux moyens d'ADNc après chirurgie de résection carcinologique étaient abaissés par rapport au taux préopératoires et qu'ils pouvaient être un facteur prédictif de l'efficacité du traitement chirurgical dans le CBP. Les patients dont les taux d'ADNc ne diminuaient pas après chirurgie étaient ceux dont la résection chirurgicale était incomplète, ou avait échouée ou chez lesquels le cancer s'avérait être métastatique [9]. Des études plus anciennes ont montré les mêmes tendances chez des patients traités par radiothérapie [28].

Dans le cancer pulmonaire il n'existe que très peu de données testant l'hypothèse de l'ADNc comme facteur prédictif. Elles sont regroupées dans le tableau II. Gautshi *et al.* ont étudié les taux d'ADNc dans le sérum et dans le plasma, avant et après chimiothérapie chez 91 patients atteints de CBNPC de stade IV après 1 à 3 cycles de chimiothérapie. Chez les patients stables ou répondeurs les concentrations médianes d'ADNc dans le sérum étaient significativement diminuées (mais pas dans les échantillons plasmatiques) ; chez les patients « progressifs », les auteurs observaient une augmentation des taux médian d'ADNc dans le plasma mais pas dans le sérum [29]. Cette discordance entre les observations faites dans le plasma et dans le sérum n'était pas bien expliquée par les auteurs et ces derniers ont conclu que la concentration d'ADNc n'était pas un bon facteur prédictif de la réponse au traitement. On sait aussi désormais que la concentration d'ADNc dans le sérum est plus importante que dans le plasma, et que la fraction d'ADN tumoral est relativement moins importante dans le sérum que dans le plasma (il y a plus par exemple d'ADN issu des leucocytes), ce qui pourrait expliquer cette discordance [30]. D'ailleurs, les récentes recommandations sur l'utilisation de l'ADNc en oncologie recommandent l'utilisation d'ADN extraits de plasma et non de sérum [31]. Plus récemment, Lee *et al.* ont étudié les taux d'ADNc chez 108 non-fumeurs porteurs d'adénocarcinomes pulmonaire avant et après 3 cycles de chimiothérapie ou d'un traitement par gefitinib. Les patients étaient divisés en 3 tertiles – basse, moyenne et haute concentration – en fonction de leur concentration initiale en ADNc. Dans le tertile de basse concentration, le taux médian d'ADNc augmentait après traitement, indépendamment et quelle que soit la réponse tumorale. Dans ce groupe, l'augmentation de la concentration d'ADNc était plus importante chez les patients progressant sous chimiothérapie (augmentation de 20,5%) que chez les

patients stables (augmentation de 10,9%) et que chez les patients répondeurs (augmentation de 18,9%). Dans le tertile intermédiaire il n'y avait aucune différence significative en termes de concentration avant et après traitement. Enfin, dans le dernier tertile (concentration initiale en ADNc élevée), on observait une diminution des taux médians d'ADNc après traitement quelle que soit la réponse au traitement. Dans cette étude la cinétique du taux d'ADNc n'était pas associée à la réponse à la chimiothérapie, soulignant le fait que l'analyse de l'ADNc total ne reflète pas exactement le taux d'ADNc tumoral [32]. Pour terminer, Kumar et al. ont étudié les taux d'ADNc chez 42 patients porteurs d'un CBNPC avant et après trois cycles de chimiothérapie. Ils ont retrouvés des résultats similaires à ceux de Gautshi [33].

Ces études sur l'utilisation de l'ADNc comme facteur prédictif de la réponse au traitement présentent donc des résultats contradictoires. Il faut noter que ces études ont été menées sur un nombre limité de patients et avec des critères d'inclusion hétérogènes. Les deux autres difficultés sont le manque de standardisation et de reproductibilité des mesures de concentration totale en ADNc, et à nouveau, le fait que la fraction d'ADNc mesurée et monitorée est la fraction totale et non la fraction tumorale.

L'ADNC : FACTEUR PRONOSTIC ?

Plusieurs études ont démontré l'intérêt de l'ADNc en tant que facteur pronostic dans le CBNPC. Par exemple Lee et al ont montré une association significative entre la concentration initiale d'ADNc et la survie globale. On rappelle que dans leur étude, 108 patients étaient divisés en 3 tertiles : basse, moyenne et haute concentration. Le Hazard ratio concernant la survie globale du tertile haute concentration par rapport au tertile basse concentration était de 2,7 (IC 95% 1,16-4,91). Autrement dit, la survie globale était de 16,8 mois dans le tertile haute concentration initiale d'ADNc versus 28,6 mois dans le tertile basse concentration initiale d'ADNc [32]. Cette association a d'ailleurs été retrouvée dans d'autres travaux. Sozzi et al ont également montré qu'une concentration élevée d'ADNc était significativement associée à une plus faible survie à 5 ans [34].

Une concentration élevée d'ADNc avant traitement serait donc un marqueur pronostic indépendant (ajusté à l'âge, au stade de la maladie et à l'antécédent de traitement) dans le CBNPC, comme le montre le tableau III reprenant les études principales ayant évalué l'intérêt de l'ADNc en tant que facteur pronostic dans le cancer pulmonaire [25,29,32,34,35]. Cette observation peut s'expliquer par au moins deux éléments. D'un part, nous avons vu précédemment que l'ADNc était un reflet de la masse tumorale et d'autre part l'ADNc est issue – entre autres – des cellules tumorales circulantes, elles-mêmes impliquée dans le processus métastatique [2,6].

INTÉRÊT DE L'ANALYSE QUALITATIVE DE L'ADNC

La recherche et la détermination des mutations somatiques fait désormais partie de la pratique courante en oncologie thoracique. Par exemple, la connaissance du statut mutationnel EGFR est indispensable pour sélectionner les patients éligibles à un traitement par inhibiteur de tyrosine kinase spécifique de l'EGFR [36,37]. Dans le domaine de l'oncologie thoracique, l'obtention de tissu tumoral nécessite des gestes invasifs ((écho-)endoscopie bronchique, ponction transpariétale scano-guidée, voire chirurgie). Ces gestes, pratiqués le plus souvent chez des patients âgés et fatigués, sont souvent traumatisants. En outre, la quantité de tissu tumoral obtenu est bien souvent limitée. Pourtant les analyses de génétiques moléculaires (recherche de mutation et FISH pour les recherches de réarrangements), qui sont venues s'ajouter aux techniques traditionnelles d'anatomopathologie requièrent toujours plus de matériel tumoral [38,39]. C'est pourquoi le concept de biopsie liquide est particulièrement intéressant dans ce domaine. Plusieurs auteurs se sont donc intéressés au diagnostic des mutations somatiques à partir de l'ADNc. Cette technique non-invasive présente en effet l'avantage d'être facilement disponible (simple prélèvement sanguin), notamment en cours de traitement ou lors de la rechute. Plusieurs études ont ainsi montrés qu'il était possible de détecter une mutation de l'EGFR dans l'ADNc et que celle-ci était identique à celle retrouvée dans le tissu tumoral [40-50]. Des résultats similaires ont été obtenus avec KRAS et p53 [51-53]. L'association entre la présence d'une mutation EGFR dans l'ADNc et l'efficacité d'un traitement par gefitinib a également été rapportée [45]. Notre équipe a publié récemment des résultats originaux. Une recherche de mutation a été effectuée sur soixante-huit couples d'ADN tumoral tissulaire (ADNt) et d'ADNc, issus de cancer broncho-pulmonaire des non-fumeurs de l'étude BioCAST [54]. L'originalité venait du fait que – pour la première fois – 5 gènes étaient testés en même temps (EGFR, KRAS, HER2, BRAF, PIK3), et que la méthode de détection des mutations reposait sur le séquençage de nouvelle génération, autorisant ainsi la détection de mutations faiblement représentées dans le plasma (moins de 1%). La spécificité du test était bonne (87%), mais la sensibilité était plus limitée (58%) en raison essentiellement d'une plus grande difficulté technique à détecter convenablement les délétions/insertions (très fréquentes dans l'exon 19 de l'EGFR). En restreignant les analyses aux stades IV uniquement, la sensibilité atteint alors 65% [26]. Le tableau IV reprend les différentes études s'étant intéressées à la performance diagnostique de la détection de mutations somatiques dans l'ADNc pour les cancers broncho-pulmonaires. De manière générale, alors que la spécificité est constamment correcte, la sensibilité de ces méthodes de détection reste variable et parfois limitée. Ces travaux comportent plusieurs limites parmi lesquelles le petit effectif des séries. En outre, certains ne comparent pas les résultats obtenus dans l'ADNc à ceux obtenus dans l'ADN du tissu tumoral [55-57]. La plupart concernent par contre des stades IV exclusivement. Pour interpréter correctement ces résultats il faut en outre prendre en considération l'hétérogénéité tumorale. Il existe en effet, au sein d'une même tumeur,

différentes sous-populations tumorales (clones) pouvant présenter des profils mutationnels différents. Dans un processus dynamique, certains clones peuvent ainsi prendre l'avantage sur les autres et constituer pour un temps, le potentiel agressif de la tumeur [58]. Lorsque la biopsie est de petite taille, celle-ci ne représente donc pas l'intégralité du profil de la tumeur, et pas forcément le clone agressif. Dans ce cas, l'ADNc revêt un intérêt particulier, permettant l'analyse du profil mutationnel de la tumeur entière – ou du moins du clone actuellement majoritaire - et non d'une seule sous population tumorale.

Ainsi, et bien que des ajustements soient encore nécessaires, l'ADNc est un marqueur extrêmement prometteur pour le diagnostic non-invasif du profil moléculaire tumoral (biopsie liquide). La recherche dans ce domaine en est d'ailleurs à un stade translationnel et le passage dans la pratique devrait se faire dans les toutes prochaines années.

CONCLUSION

L'ADNc est un biomarqueur très prometteur en oncologie thoracique. On retiendra tout particulièrement l'aspect prédictif du suivi de la fraction mutée EGFR sous traitement par TKI ainsi que la surveillance de l'émergence d'une fraction porteuse de mutation de résistance ; l'aspect pronostic de la concentration initiale en ADNc total ; et enfin les possibilités de déterminer le profil somatique tumoral de manière non-invasive.

Il est en outre désormais important de travailler vers une standardisation et une amélioration de la qualité des processus de quantification dans ce domaine. On peut ainsi saluer la publication des premières recommandations dans le domaine de l'ADNc en oncologie [31].

L'ADNc est donc un outil multifonction prometteur en oncologie thoracique et son utilisation dans la pratique devrait être rapide désormais.

RÉFÉRENCES

1. Mandel P, Metais P. Les Acides Nucleiques Du Plasma Sanguin Chez L'Homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948;142:241-3.
2. Ulivi P, Silvestrini R. Role of quantitative and qualitative characteristics of free circulating DNA in the management of patients with non-small cell lung cancer. *Cell Oncol (Dordr)* 2013; 36:439-48.
3. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011;11:426-37.
4. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10:472-84.
5. Butt AN, Swaminathan R. Overview of circulating nucleic acids in plasma/serums. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 2008;1137:236-242.
6. Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—A critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta* 2010;411:1611-2.
7. Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: Practical aspects and biological significance. *Mutat Res* 2007;635:105-17.
8. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999;64:218-24.
9. Sozzi G, Conte D, Mariani L, Lo Vullo S, Roz L, Lombardo C et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res* 2001;61:4675-8.
10. Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:3902-8.
11. Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, Jermann M, Marx A, Chassé E, et al. Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004;22:4157-4164.
12. Herrera L.J, Raja S, Goodwing WE, El-Hefnawy T, Kelly L, Luketich JD et al. Quantitative analysis of circulating plasma DNA as a tumor marker in thoracic malignancies. *Clin Chem* 2005;51:113-118.
13. Paci M, Maramotti S, Bellesia E, Formisano D, Albertazzi L, Ricchetti T, et al. Circulating plasma DNA as Qualitative and quantitative free DNA in NSCLC diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2009;64:92-97.

14. Yoon KA, Park S, Lee SH, Kim JH, Lee JS. Comparison of circulating plasma DNA levels between lung cancer patients and healthy controls. *Mol Diagn* 2009;11:182-185.
15. Kumar S, Guleria R, Singh V, Bharti AC, Mohan A, Das BC. Efficacy of circulating plasma DNA as a diagnostic tool for advanced non-small cell lung cancer and its predictive utility for survival and response to chemotherapy. *Lung Cancer* 2010;70:211-217.
16. Szpechcinski A, Chorostowska-Wynimko J, Maszkowska-Kopij K, Danciewicz M, Kowalewski J, et al. Quantitative analysis of free-circulating DNA in plasma of patients with resectable NSCLC. *Expert Opin.Biol* 2012;12(Suppl 1):S3–S9.
17. Ulivi P, Mercatali L, Casoni GL, Scarpi E, Bucchi L, Silvestrini R, et al. Multiple marker detection in peripheral blood for NSCLC. diagnosis. *PLoS One* 2013;8:e57401.
18. Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem* 2013;59:110-8.
19. Casoni GL, Ulivi P, Mercatali L, Chilosi M, Tomassetti S, Romagnoli M, et al. Increased levels of free circulating DNA in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biol Markers* 2010;25:229-35.
20. Ye L, Ma GH, Chen L, Li M, Liu JL, Yang K, et al. Quantification of circulating cell-free DNA in the serum of patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Lung* 2010;188:469-74.
21. Zhang Y, Wang R, Song H, Huang G, Yi J, Zheng Y, et al. Methylation of multiple genes as a candidate biomarker in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 2011;303:21-8.
22. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, 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 USA* 1998;95:11891-6.
23. Guo Z, Zhao C, Wang Z. MicroRNAs as ideal biomarkers for the diagnosis of lung cancer. *Tumor Biol* 2014;23.
24. Qi Z, Yang DY, Cao J. Increased micro-RNA 17, 21, and 192 gene expressions improve early diagnosis in non-small cell lung cancer. *Med Oncol* 2014;31:195.
25. Fournié GJ, Courtin JP, Laval F, Chalé JJ, Pourrat JP, Pujazon MC, et al. Plasma DNA as a marker of cancerous cell death: Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours. *Cancer Lett* 1995;91:221-227.

26. Couraud S, Vaca-Paniagua F, Villar S, Oliver J, Schuster T, Blanché H, et al. Noninvasive Diagnosis of Actionable Mutations by Deep Sequencing of Circulating Free DNA in Lung Cancer from Never-Smokers: A Proof-of-Concept Study from BioCAST/IFCT-1002. *Clin Cancer Res* 2014;20:4613-24.
27. Rago C, Huso DL, Dielh F, Karim B, Liu G, Papadopoulos N, et al. Serial assessment of human tumor burdens in mice by the analysis of circulating DNA. *Cancer Res* 2007;67:9364-70.
28. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977;37:646-50.
29. Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, Jermann M, Marx A, Chassé E, et al. Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004;22:4157-4164.
30. Vallée A, Marcq M, Bizieux A, et al. Plasma is a better source of tumor-derived circulating cell-free DNA than serum for the detection of EGFR alterations in lung tumor patients. *Lung Cancer* 2013;82:373-4.
31. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta* 2013;424:222-30.
32. Lee YJ, Yonn KA, Han JY, Kim HT, Yun T, Lee GK, et al. Circulating Cell-free DNA in plasma of never smokers with advanced lung adenocarcinoma receiving gefitinib or standard chemotherapy as first line therapy. *Clin Cancer Res* 2011;17:5179-5187.
33. Kumar S, Guleria R, Singh V, Bharti AC, Mohan A, Das BC. Plasma DNA level in predicting therapeutic efficacy in advanced nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J* 2010;36:885-892.
34. Sozzi G, Roz L, Conte D, Mariani L, Andriani F, Lo Vullo S, et al. Plasma DNA quantification in lung cancer computed tomography screening: five-year results of a prospective study. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:69-74.
35. Van der Drift MA, Bernard EA, Klaassen CH, et al. Circulating DNA is a non-invasive prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2010;68:283-7.
36. Peters S, Adjei AA, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2012;23 Suppl 7:vii56-64.
37. Aung KL, Board R, et al. Current status and future potential of somatic mutation testing from circulating free DNA in patients with solid tumours. *Hugo J* 2010;4:11–21.

38. Thunnissen E, Kerr KM, Herth FJ, Lantuejoul S, Papotti M, Rintoul RC, et al. The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples. Practical approach of a working group. *Lung Cancer* 2012;76:1-18.
39. Travis WD, Rekhtman N, Riley GJ, Geisinger KR, Asamura H, Brambilla E, et al. Pathologic diagnosis of advanced lung cancer based on small biopsies and cytology: a paradigm shift. *J Thorac Oncol* 2010;5:411-4.
40. Kimura H, Suminoe M, Kasahara K, Sone T, Araya T, Tamori S, et al. Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA). *Br J Cancer* 2007;97:778-84.
41. Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 2009;361:958-67.
42. Kuang Y, Rogers A, Yeap BY, Wang L, Makrigiorgos M, Vetrand K, et al. Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:2630-6.
43. Taniguchi K, Uchida J, Nishino K, Kumagai T, Okuyama T, Okami J, et al. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2011;17:7808-15.
44. Goto K, Ichinose Y, Ohe Y, Yamamoto N, Negoro S, Nishio K, et al. Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum: from IPASS, a phase III study of gefitinib or carboplatin/paclitaxel in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012;7:115-21.
45. Yam I, Lam DC-L, Chan K, Chung-Man Ho J, Ip M, Lam W-K, et al. EGFR array: uses in the detection of plasma EGFR mutations in non-small cell lung cancer patients. *J Thorac Oncol* 2012;7:1131-40.
46. Zhao X, Han R-B, Zhao J, Wang J, Yang F, Zhong W, et al. Comparison of epidermal growth factor receptor mutation statuses in tissue and plasma in stage I-IV non-small cell lung cancer patients. *Respiration* 2013;85:119-25.
47. Mok TS, Wu YL, Lee JS, Yu C-J, Sriuranpong V, Wen W, et al. Detection of EGFR-activating mutations from plasma DNA as a potent predictor of survival outcomes in FASTACT 2: A randomized phase III study on intercalated combination of erlotinib (E) and chemotherapy (C). *J Clin Oncol* 2013;31(Suppl):Abstract 8021.

48. Kim H-R, Lee SY, Hyun D-S, Lee MK, Lee H-K, Choi C-M, et al. Detection of EGFR mutations in circulating free DNA by PNA-mediated PCR clamping. *J Exp Clin Cancer Res* 2013;32:50.
49. Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, McCormack R, Webster A, et al. First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *Br J Cancer* 2014;110:55-62.
50. Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, Mach SL, O'Connell A, Messineo MM, et al. Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin Cancer Res* 2014;20:1698-705.
51. Wang S, An T, Wang J, Zhao J, Wang Z, Zhuo M, et al. Potential Clinical Significance of a Plasma-Based KRAS Mutation Analysis in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:1324–30.
52. Narayan A, Carriero NJ, Gettinger SN, Kluytenaar J, Kozak KR, Yock TI, et al. Ultrasensitive measurement of hotspot mutations in tumor DNA in blood using error-suppressed multiplexed deep sequencing. *Cancer Res* 2012;72:3492–8.
53. Nygaard AD, Garm Spindler K-L, Pallisgaard N, Andersen RF, Jakobsen A. The prognostic value of KRAS mutated plasma DNA in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2013;79:312–7.
54. Couraud S, Labonne S, Missy P, Morin F, Tran Q, Derooy A, et al. Lung cancer in never smokers: a French national cohort (BioCAST/IFCT-1002). *Rev Mal Respir* 2013;30:576-83.
55. Jian G, Songwen Z, Ling Z, Qinfang D, Jie Z, Liang T, et al. Prediction of epidermal growth factor receptor mutations in the plasma/pleural effusion to efficacy of gefitinib treatment in advanced non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010;136:1341–7.
56. Nakamura T, Sueoka-Aragane N, Iwanaga K, Sato A, Komiya K, Abe T, et al. A noninvasive system for monitoring resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors with plasma DNA. *J Thorac Oncol* 2011;6:1639–48.
57. Sakai K, Horiike A, Irwin DL, Kudo K, Fujita Y, Tanimoto A, et al. Detection of epidermal growth factor receptor T790M mutation in plasma DNA from patients refractory to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Sci* 2013;104:1198-204.
58. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883-92.

XII. DIAGNOSTIC NON INVASIF DES MUTATIONS SOMATIQUES GRACE A L'ADN TUMORAL CIRCULANT

A. Projet d'analyse ancillaire de l'étude BioCAST / IFCT-1002

Le cancer broncho-pulmonaire des non-fumeurs est un excellent modèle pour le diagnostic non-invasif des mutations somatiques compte tenu de la grande fréquence et de la diversité de ces mutations.

L'objectif de cette première étude ancillaire de BioCAST était de développer un test pour le diagnostic concomitant de mutations sur les biomarqueurs EGFR, KRAS, BRAF, HER2 et PIK3, utilisant la technique du séquençage de nouvelle génération, et de tester la performance diagnostic sur des échantillons d'ADN circulant en prenant l'ADN tumoral issu du tissu néoplasique comme référence.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire Mécanisme Moléculaire et Biomarqueurs du Centre International de Recherche sur le Cancer, sous la direction du Dr Magali Olivier.

L'étude présentée ici est une étude pilote de type « preuve du concept » menée sur les premiers échantillons inclus dans le cadre de l'étude BioCAST (n=106). Les échantillons sanguins étaient collectés dans le cadre du protocole. Les échantillons d'ADN tumoral issus du tissu néoplasique ont été collectés auprès des archives des différentes plateformes de biologie moléculaire du cancer (n=18). L'étude complète (non débutée) aura pour objectif d'optimiser le test et de le tester à plus grande échelle sur l'ensemble de la série.

Outre les autorisations réglementaires de BioCAST (voir page 66), cette étude a été validée par le comité d'éthique du CIRC en date du 16 mai 2012, et par le conseil d'administration de l'IFCT en date du 2 mars 2012.

Brièvement, la méthodologie de cette étude pilote consistait en plusieurs étapes :

- Extraction de l'ADN circulant à partir de 1000µL de plasma selon le protocole du laboratoire MMB basé sur le kit Qiagen QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Quiagen, Venlo, Pays-Bas).
- Les régions ciblées pour le séquençage correspondent aux régions codantes et leurs régions introniques adjacentes dans les gènes étudiés. Des amorces PCR spécifiques ont été dessinées pour l'amplification de ces régions codantes. Un total de 12 amplicons permettait de couvrir les régions ciblées.
- Les PCR étaient réalisées en multiplex et le séquençage était effectué sur un séquenceur Ion Torrent PGM (Life technologies, Carlsbad, CA, États-Unis) selon le protocole recommandé.
- Pour chacun des biomarqueurs, les caractéristiques intrinsèques (sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative) des tests diagnostiques étaient calculées en prenant les résultats obtenus dans le tissu tumoral comme référence.

B. ARTICLE – RESULTATS de l'analyse du profil moléculaire somatique par test multiplex et séquençage de nouvelle génération sur ADN circulant (*Clinical Cancer Research*, 2014).

Couraud S, Vaca-Paniagua F, Villar S, Oliver J, Schuster T, Blanché H, Girard N, Trédaniel J, Guilleminault L, Gervais R, Prim N, Vincent M, Margery J, Larivé S, Foucher P, Duvert B, Vallee M, Le Calvez-Kelm F, McKay J, Missy P, Morin F, Zalcman G, Olivier M, Souquet PJ; BioCAST/IFCT-1002 investigators. Noninvasive Diagnosis of Actionable Mutations by Deep Sequencing of Circulating Free DNA in Lung Cancer from Never-Smokers: A Proof-of-Concept Study from BioCAST/IFCT-1002. *Clin Cancer Res*. 2014 Sep 1;20(17):4613-24.

Clinical Cancer Research



Noninvasive Diagnosis of Actionable Mutations by Deep Sequencing of Circulating Free DNA in Lung Cancer from Never-Smokers: A Proof-of-Concept Study from BioCAST/IFCT-1002

Sébastien Couraud, Felipe Vaca-Paniagua, Stéphanie Villar, et al.

Clin Cancer Res 2014;20:4613-4624. Published OnlineFirst July 10, 2014.

Updated version Access the most recent version of this article at:
doi:[10.1158/1078-0432.CCR-13-3063](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3063)

Supplementary Material Access the most recent supplemental material at:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2014/07/25/1078-0432.CCR-13-3063.DC1.html>

Cited Articles This article cites by 49 articles, 13 of which you can access for free at:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/20/17/4613.full.html#ref-list-1>

E-mail alerts [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

Reprints and Subscriptions To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.

Permissions To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org.

Noninvasive Diagnosis of Actionable Mutations by Deep Sequencing of Circulating Free DNA in Lung Cancer from Never-Smokers: A Proof-of-Concept Study from BioCAST/IFCT-1002

Sébastien Couraud^{1,2,3}, Felipe Vaca-Paniagua^{1,4,5}, Stéphanie Villar¹, Javier Oliver⁶, Tibor Schuster^{7,8}, Hélène Blanche⁹, Nicolas Girard^{10,11}, Jean Trédaniel¹², Laurent Guilleminault¹³, Radj Gervais¹⁴, Nathalie Prim¹⁵, Michel Vincent¹⁶, Jacques Margery¹⁷, Sébastien Larivé¹⁸, Pascal Foucher¹⁹, Bernard Duvert²⁰, Maxime Vallee⁶, Florence Le Calvez-Kelm⁶, James McKay⁶, Pascale Missy²¹, Franck Morin²¹, Gérard Zalman²², Magali Olivier¹, and Pierre-Jean Souquet^{2,3} for the BioCAST/IFCT-1002 investigators

Abstract

Purpose: Tumor somatic mutation analysis is part of the standard management of metastatic lung cancer. However, physicians often have to deal with small biopsies and consequently with challenging mutation testing. Circulating free DNA (cfDNA) is a promising tool for accessing the tumor genome as a liquid biopsy. Here, we evaluated next-generation sequencing (NGS) on cfDNA samples obtained from a consecutive series of patients for the screening of a range of clinically relevant mutations.

Experimental Design: A total of 107 plasma samples were collected from the BioCAST/IFCT-1002 lung cancer study (never-smokers cohort). Matched tumor DNA (tDNA) was obtained for 68 cases. Multiplex PCR-based assays were designed to target specific coding regions in *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *ERBB2*, and *PIK3CA* genes, and amplicon sequencing was performed at deep coverage on the cfDNA/tDNA pairs using the NGS IonTorrent Personal Genome Machine Platform.

Results: CfDNA concentration in plasma was significantly associated with both stage and number of metastatic sites. In tDNA, 50 mutations (36 *EGFR*, 5 *ERBB2*, 4 *KRAS*, 3 *BRAF*, and 2 *PIK3CA*) were identified, of which 26 were detected in cfDNA. Sensitivity of the test was 58% (95% confidence interval, 43%–71%) and the estimated specificity was 87% (62%–96%).

Conclusion: These data demonstrate the feasibility and potential utility of mutation screening in cfDNA using IonTorrent NGS for the detection of a range of tumor biomarkers in patients with metastatic lung cancer. *Clin Cancer Res*; 20(17); 4613–24. ©2014 AACR.

¹International Agency for Research on Cancer, Section of Mechanisms of Carcinogenesis, Molecular Mechanisms and Biomarkers Group, Lyon Cedex, France. ²Department of Pulmonology, Lyon Sud University Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. ³Lyon Sud Faculty of Medicine, Lyon 1 University, Pierre Bénite Cedex, France. ⁴Laboratorio de Genómica, Instituto Nacional de Cancerología, Tlalpan, México. ⁵Unidad de Biomedicina, FES-Iztacala, UNAM, México. ⁶International Agency for Research on Cancer, Genetic Cancer Susceptibility Group, Lyon Cedex, France. ⁷Centre for Clinical Epidemiology, Lady Davis Institute for Medical Research, Jewish General Hospital, Montreal, Quebec, Canada. ⁸Department of Epidemiology and Biostatistics, McGill University, Montreal, Quebec, Canada. ⁹The Jean Dausset Foundation – CEPH, Paris, France. ¹⁰Department of Respiratory Medicine, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. ¹¹Claude Bernard University Lyon 1, Lyon (Bron), France. ¹²Department of Pulmonology, Paris – Saint Joseph Hospital, and Sorbonne Paris Cité university, France. ¹³Pulmonology Unit, University Hospital of Tours, France and François Rabelais University, Respiratory Diseases Study Centre, Tours, France. ¹⁴François Baclesse Cancer Institute, Caen, France. ¹⁵Department of Chest, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France. ¹⁶Department of Pulmonology, Saint Joseph-Saint Luc Hospital, Lyon, France. ¹⁷Department of Respiratory Department, Percy Military Hospital, Clamart, France. ¹⁸Department of

Pulmonology, Mâcon Hospital, Mâcon, France. ¹⁹Thoracic Oncology, Dijon University Hospital, Dijon, France. ²⁰Department of Oncology, Montélimar Hospital, Montélimar, France. ²¹Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique, Paris, France. ²²Pulmonology and Thoracic Oncology Unit and UMR 1086 Inserm "Cancers and Preventions," Caen University Hospital, Caen, France.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

S. Couraud and F. Vaca-Paniagua contributed equally to this article.

M. Olivier and P.-J. Souquet contributed equally to this article.

Corresponding Author: Sébastien Couraud, CH Lyon Sud – Hospices Civils de Lyon, Service de Pneumologie, 165 chemin du Grand Revoyet, 69495 Pierre-Bénite CEDEX. Phone: 33-4-78-86-44-05; Fax: 33-4-78-86-44-19; E-mail: sebastien.couraud@chu-lyon.fr

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3063

©2014 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

Obtaining a sufficient amount of tumor material for the analysis of somatic mutations in targetable genes can be challenging. Circulating free DNA (cfDNA) originating in the tumor has been proposed as a tool for liquid biopsy. However, the level of detection of tumor mutations in cfDNA is limited by the sensitivity of the detection method used. We have developed an IonTorrent-based deep-sequencing multiplex-PCR assay covering hotspot mutation regions of *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *HER2/ERBB2*, and *PIK3CA*. Taking mutations found in tumor DNA as the reference, the sensitivity of our test was 58%, and the estimated specificity was 87%. We also found that cfDNA concentration in plasma was associated with both clinical stage and number of metastatic sites. This study shows the relevance of deep sequencing for the detection of tumor mutations in cfDNA.

Introduction

Somatic mutation analysis of known or potential drugable oncogenes has gradually become part of the routine practice in thoracic oncology (1, 2). In non-small cell lung cancer (NSCLC), the type of somatic mutations and the genes affected are related to smoking status. Indeed, lung cancers in never-smokers (LCINS) harbor a specific mutation profile characterized in particular by mutations in the *EGFR* tyrosine kinase domain (3). Thus, *EGFR* mutation status is now used to select patients eligible for a treatment with a tyrosine kinase inhibitor (4–7).

In thoracic oncology, tumor samples are often limited as they are mainly obtained through minimally invasive procedures such as bronchial (ultrasono-) endoscopy or CT-guided trans-mural punctures. Testing a wide range of molecular biomarkers in addition to pathologic diagnosis may thus be challenging because of the limited amount of material that can be extracted from these small samples (8, 9).

Circulating free DNA (cfDNA) are small double-stranded fragments of DNA found in plasma. In patients with cancer, the release of cfDNA in the bloodstream is thought to be related to apoptosis, necrosis, as well as active secretion from tumor cells (10). CfDNA recently attracted growing interest in oncology for multipurpose use (11). It has been considered as a prognostic and predictive biomarker (12, 13), and as a "liquid biopsy" to perform noninvasive testing for biomarker detection (14–20). However, the main challenge remains technical because, in many cases, tumor DNA (tDNA) may only represent a very small fraction of cfDNA (21, 22). The level of detection of tumor mutations in cfDNA is thus limited by the sensitivity of the detection method used.

Massive parallel sequencing comprises a new set of promising technologies in the field of cancer research and personalized medicine. Several studies showed that these

technologies can be applied to the detection of somatic mutation and suggested that they can be used in clinical settings (23).

To date, no study has reported an inclusive multiplex analysis of relevant biomarkers in NSCLC from plasma cfDNA using massive parallel sequencing. Here, we used the IonTorrent Personal Genome Machine (PGM) for the deep sequencing of the most clinically relevant hotspot somatic mutations in tDNA and plasma cfDNA of never-smoker NSCLC patients.

Materials and Methods

Patients

Patients were consecutive cases recruited in the BioCAST/IFCT-1002 study (ClinicalTrials.gov identifier NCT01465854). BioCAST is a prospective, multicentric cohort sponsored by the French intergroup IFCT, designed to describe clinical, pathologic, and molecular epidemiology of LCINS in a French population. The detailed protocol is reported elsewhere (24). Briefly, newly diagnosed cases of NSCLC from self-declared non-smokers were included and surveyed. All patients provided written informed consent for participation in the study and consent for blood and tumor samples collection. Overall, from December 2011 to January 2013, 384 patients were included in 75 active centers. IFCT ensured the quality insurance of data management according to international standards.

The present study was planned to be restricted to the 100 first consecutive cases of patients recruited with complete blood sample and tumor molecular analysis (up to May 2012).

Ethical approval

The BioCAST study was approved by the *Sud-Est IV* Ethics Committee of Lyon and by the National Advisory Committee on Information Processing in Health, Paris. Sample collection was declared to French Ministry of Superior Education and Research and to the National Committee for Ethic in Informatics. This ancillary study was also approved by the International Agency for Research on Cancer (IARC) Ethics Committee.

Tumor DNA samples and routine tumor biomarker analysis

tDNA samples were obtained from a network of genetic laboratories. This network was initiated by the French National Cancer Institute (INCa) to perform routine molecular analysis (2). The performance and concordance of sample processing and mutation screening methods across participating centers were previously investigated in blinded cross-validation studies (25). Standards for sample collection and processing used in each laboratory are described in Supplementary Table S1. Most of the paraffin-embedded samples were first microdissected. DNA was extracted using commercial kits.

Blood samples and circulating free DNA isolation and quantification

All patients included in BioCAST underwent a blood sampling before receiving any cancer treatment. Samples were shipped at room temperature and within 24 hours from each center to the BioCAST central laboratory in Paris (Centre d'étude du polymorphisme humain - Fondation Jean Dausset). Blood samples were immediately processed upon receipt (mean time between delivery and processing: 19 ± 13 minutes) to isolate plasma. Plasma was isolated from EDTA tubes by centrifugation at 1,600 g during 10 minutes at 4°C. Plasmas were then aliquoted and stored at -80°C. Plasma samples were shipped to IARC according to international standards. CfDNA was extracted from aliquots (1 mL) of plasma using the QIAamp circulating nucleic acid kit (Qiagen) with the QIAvac 24 Plus vacuum manifold, following the manufacturer's instructions. CfDNA was quantified by picogreen.

Amplicon design and multiplex-PCR conditions

A set of 12 primers pairs was designed using Primer3 software (v4.0) with default parameters (26) to amplify sequences of 98 to 125 bp covering hotspot regions of *EGFR*, *BRAF*, *ERBB2* (*HER2*), *KRAS*, and *PIK3CA* (see Supplementary Table S2 for primer sequences and targeted regions). For amplicon production, 2 ng of DNA were used in multiplex PCR reactions (Supplementary Table S3) with the GoTaq HotStart DNA polymerase (Promega Corporation) and with the following program: 30 seconds at 94°C, 3 cycles of 30 seconds at 58.5°C, 30 seconds at 72°C, then, the annealing temperature was decreased from 0.5°C every 3 cycles until reaching 55.5°C; then 15 cycles of 30 seconds at 94°C, 45 seconds at 50°C, 30 seconds at 72°C, and a final extension of 7 minutes at 72°C.

Library preparation

One microliter of each PCR multiplex reaction was loaded on a gel to check levels of amplification and adjust for the quantity of each multiplex to be pooled by sample for equalizing multiplex representation. Multiplex pools were purified with Agencourt AMPure beads (Beckman Coulter Incorporated) and quantified by Qbit (Invitrogen Corporation). Library preparation was done using 100 ng of multiplex pools and the NEBNext End Repair Module (New England Biolabs) following the manufacturer's instructions. Individual barcodes (designed in-house and produced by Eurofins MWG Operon) were ligated to each multiplex pool for sequencing.

Next-generation sequencing with IonTorrent and variant calling

The libraries were sequenced with the IonTorrent PGM sequencer (Life Technologies) at deep coverage (aiming for 10,000X for plasma and 1,000X for tumors) using the Ion OneTouch 200 Template Kit v2 DL and Ion PGM Sequencing 200 Kit v2 with the 314 or 316 chip kits (all produced by Life Technologies), following the manufac-

turer's instructions. Six runs were performed to process all samples. For cfDNA, amplicons that failed to reach the targeted depth of coverage and were negative for an expected mutation (according to routine biomarker analysis of tDNA) were repeated in an independent run to obtain a minimum coverage of 10,000X.

The sequencing reads were aligned to the human reference hg19 genome with the IonTorrent Suite V3.4.2. The IonTorrent Variant Caller (ITVC) v3.4 was used for the detection of mutations in tDNA, setting a frequency above 5% for a variant to be called. Variant annotation was done with ANNOVAR (27). For the detection of ultra-low frequency variations in cfDNA, an in-house program was used to extract, from BAM files (Binary sequence Alignment/Map format), various statistics on read counts at the targeted hotspot positions. These statistics were used to filter variants based on three criteria: (i) minimum number of reads carrying the mutation ≥ 5 (*a priori* choice), (ii) variant allele frequency $\geq 0.2\%$, and (iii) variant reads strand orientation ratio ≥ 0.33 and ≤ 3 (*a priori* choice based on the range of strand bias values, 99% of 3,760 observations within this range, observed in plasma samples for reference alleles at positions of mutations reported in the COSMIC database within the analysed regions). To determine the minimum allele frequency threshold, we calculated the average variant allele frequencies (0.13%) for 272 non-hotspot mutations reported in the COSMIC database within the analyzed regions as an estimate of the background sequencing noise. Mutations were called if above this threshold. Mutations identified with these parameters were further checked by manual inspection of BAM files using the Integrative Genomics Viewer (IGV) 2.2 (Broad Institute, Cambridge, MA; ref. 28). Low allele frequency mutations (below 1.5%) in cfDNA were confirmed by independent PCR reactions and resequencing of the amplicons indicative of the presence of mutations.

Statistical analysis

Categorical variables are expressed in percent and compared with χ^2 tests if expected count in each category is at least 5. Plausibility of normal distribution assumption for continuous variables was assessed with the one-sample Kolmogorov-Smirnov test. Continuous variables are expressed in mean and SD or median and interquartile range (IQR) if non-normally distributed. Differences in distribution of continuous variables between two independent samples were assessed by Mann-Whitney *U* test, or Kruskal-Wallis one-way ANOVA when comparing more than two independent samples. Correlations between non-normal distributed variables were assessed with the Spearman correlation coefficient (ρ).

Tests using plasma cfDNA were compared with tDNA analysis, which was considered as the reference. True positives were considered when both tDNA and cfDNA samples carried the same mutation and true negatives when both samples had no mutation; false positives were considered when a mutation was found in cfDNA

but not in tDNA; and false negatives when a mutation was found in tDNA but not in cfDNA. Sensitivity and specificity were calculated as appropriate. In addition, we computed the mutation detection rate (n mutation detected in cfDNA/ n mutation detected in tDNA) and concordance rate [(true positive + true negative)/ n]. All analyses were performed with IBM SPSS Statistics version 20 (IBM Corp). All statistical tests were conducted two sided and a P value <0.05 was considered to indicate statistical significance. No correction of P values was performed in the course of multiple testing; however, results of all performed tests were thoroughly reported, allowing for an informal adjustment for multiplicity while reviewing the data (29). To express uncertainty of estimated probabilities, 95% Wilson confidence intervals (CI) were reported.

Results

cfDNA and clinical correlates

One hundred and seven patients were included in this study (Supplementary Fig. S1). CfDNA extraction failed in one sample. The main characteristics of the remaining 106 patients are shown in Table 1. Most of patients were women (88%) with adenocarcinoma (86%) and stage IV disease (75%). Characteristics of patients included in the molecular analysis ($n = 68$), and those with a stage IV disease ($n = 50$) are also shown in Table 1. These two subpopulations were similar to their respective complement populations except that adenocarcinomas were more frequently represented ($P = 0.035$ and 0.005 , respectively).

Overall, the median cfDNA concentration in plasma samples was 67.1 ng/mL (IQR = 122.11 ng/mL). CfDNA concentration was not associated with the histologic subtype, tumor size ("T"), or node status ("N"). However, cfDNA concentrations were significantly higher in stage IV cases when compared with stages I to III (median concentration 92.3 ng/mL vs. 34.7, respectively; $P = 0.002$), and in patients with higher number of metastatic sites (Table 2 and Supplementary Fig. S2). CfDNA concentrations were also significantly correlated, although modestly, both to stage and number of metastatic sites (Table 2).

Next-generation sequencing of tDNA and cfDNA with the IonTorrent PGM platform

Among the 107 patients recruited, 68 had both cfDNA and tDNA available for molecular analyses. The 68 matched cfDNA/tDNA samples were analyzed by deep sequencing (Supplementary Fig. S1). In tDNA, a hotspot mutation was found in 50 samples (74%) while 18 samples (26%) were wild-type at hotspot positions (Supplementary Table S4). Five mutations identified by next-generation sequencing (NGS) were not detected by routine clinical biomarker analyses. Among them, two had not been tested for the corresponding amplicons by routine clinical biomarker analyses, and three had variant allele frequencies $\leq 25\%$

(which is the usual limit of level of detection by biomarker assays used in clinical settings). In addition, one tumor mutation expected from clinical testing was not confirmed by NGS. As shown in Fig. 1, mutations were mainly located in *EGFR* exon 19 (44%) and *EGFR* exon 21 (18%). No mutation was found in *PIK3CA* exon 20, *BRAF* exon 11, *KRAS* exon 3, and *ERBB2* exon 19. No sample was found to carry multiple mutations. Most mutations were insertions or deletions ($n = 29$; 58%). The median mutant allele frequency was 20% ($\pm 29\%$) in tDNA sample.

In cfDNA, seven of the 50 (14%) mutations expected from tDNA results were called by the manufacturer's ITVC. However, using the in-house program and filtering strategy described in the Materials and Methods section, 28 (56%) tumor mutations were found in cfDNA with allele frequencies ranging from 0.2% to 44% (median $\pm$ IQR = $2.0\% \pm 12\%$; Fig. 1 and Supplementary Table S4). Three cfDNA samples had hotspot mutations (two in *EGFR* and one in *PIK3CA*) that were not called in tDNA and were thus considered as false positives. However, examination of the tDNA BAM files with IGV showed that two of these mutations were present at allele frequencies below 5% (allele frequency threshold value used for variant calling in tDNA).

Mutation detection in cfDNA and clinical correlates

Results of the comparative analyses of cfDNA and tDNA, using tDNA as reference, are presented in Table 3. When evaluating each amplicon independently, sensitivity ranged from 55% for *EGFR* exon 19 to 100% for *EGFR* exon 18. Overall, considering all amplicons, the sensitivity was 58% (95% CI, 43%–71%), the mutation detection rate was 52%, and the concordance rate was 68%. We estimated the specificity of the assay by taking into account only cases that reached at least 10,000X of coverage for cfDNA and 50X in tDNA (Table 4). We obtained a specificity value of 86% for *PIK3CA* exon 9, 88% for *EGFR* exon 19, 100% for other amplicons, and 87% (62%–96%) overall.

Although it did not reach statistical significance, there was a trend for a better detection rate of point mutations compared with insertions/deletions: in the 19 patients with a tDNA mutation but no mutation detected in cfDNA, six tDNA mutations (32%) were point mutations and 13 (68%) were insertions or deletions compared with 15 and 16, respectively, for true positives ($P = 0.376$). Among cfDNA-positive patients, no correlation was found between mutant allele frequency in plasma and mutant allele frequency in tumor (Spearman $\rho = -0.227$, $P = 0.246$), nor between mutation concentration in plasma (computed as mutant allele frequency in cfDNA multiplied by cfDNA concentration in ng/mL) and mutant allele frequency in tumor (Spearman $\rho = -0.051$, $P = 0.797$). In a *posthoc* analysis restricted to stage IV cases only ($n = 50$), the sensitivity was higher 65% (Supplementary Table S5) but we found no significant difference or correlation between the detection of mutation in cfDNA and disease stage or any other clinical variable (not shown).

Table 1. Main characteristics of patients and samples included in the study

		All patients		Patients with paired samples analyzed by NGS		P ^a
		n = 106	%	n = 68	%	
Sex	Male	13	12.3%	10	14.7%	0.370 ^b
	Female	93	87.7%	58	85.3%	
Age at diagnosis (mean ± SD)		68.7 ± 13.7		68.0 ± 13.6		0.498
Geographical origin	Africa	5	5.4%	4	6.5%	1.0 ^{b, c}
	Europe	84	91.3%	56	90.3%	
	Asia	1	1.1%	1	1.6%	
	Caribbean	2	2.2%	1	1.6%	
	Missing	14		6		
Histology	SCC	8	7.5%	2	2.9%	0.035 ^d
	ADC	91	85.8%	62	91.2%	
	LCC	4	3.8%	2	2.9%	
	Other ^e	3	2.8%	2	2.9%	
TTF1 Immunostaining	Negative	16	15.1%	7	10.3%	NC
	Positive	83	78.3%	56	82.4%	
	Not required	7	6.6%	5	7.4%	
tDNA sample origin	Tumor	68	64.2%	42	61.8%	NC
	Nodes	5	4.7%	3	4.4%	
	Metastasis	33	31.1%	23	33.8%	
tDNA sample type	Biopsy	95	89.6%	59	86.8%	0.321 ^b
	Cytology	11	10.4%	9	13.2%	
Stage	Stage I	10	9.6%	6	9.0%	0.810 ^f
	Stage II	3	2.9%	2	3.0%	
	Stage III	13	12.5%	9	13.4%	
	Stage IV	78	75.0%	50	74.6%	
	Missing ^g	2		1		
Number of metastatic sites	None	27	26.0%	18	26.5%	0.950
	1 site	33	31.7%	22	32.4%	
	2+ sites	44	42.3%	28	41.2%	
	Missing	2		—		

NOTE: A total of 106 were included, 68 had matched samples considered for NGS analysis.

Abbreviations: NC, not computed; SCC, squamous cell carcinoma; ADC, adenocarcinoma; LCC, large cell carcinoma.

^aP value was computed between samples included in the NGS analysis (n = 68) and those which were excluded (n = 38; column not shown).^bFisher exact test (two-sided); others are χ^2 tests (categorical) or Student (continuous).^cP value was computed between the European and the non-European categories.^dP value was computed between the adenocarcinoma and the non-adenocarcinoma categories.^eIncludes one adenosquamous carcinoma and two sarcomatoid carcinomas.^fP value computed between the stage I to III and the stage IV categories.^gOne was recorded as "nonmetastatic disease not otherwise specified" in the database.

Discussion

In this proof-of-concept study, we assessed the performance of the NGS IonTorrent PGM platform for the detection of tumor mutations in cfDNA using samples collected in conditions close to routine practice. Assay's sensitivity was 58% (26 mutations on 50 detected). CfDNA concentration was positively associated with tumor stage and with the number of metastatic sites,

in agreement with other studies in lung and other cancer types (11–13). NGS for the detection of tumor mutation in cfDNA may thus be clinically meaningful because biomarker analysis is currently only useful for the selection of treatment in patients with lung cancer with metastatic disease.

To our knowledge, this study is the first to report the use of the Ion Torrent PGM for the detection of tumor mutations in cfDNA. The main advantage of this technology is that it

Table 2. cfDNA concentrations according to histology and stage, and correlations between cfDNA concentration and the corresponding variable in all samples ($n = 106$)

		<i>n</i>	cfDNA concentration Median $\pm$ IQR (in ng/mL)	<i>P</i>	Spearman ρ	<i>P</i> _{correlation}
Histology	Non-adenocarcinoma	15	50.2 $\pm$ 71.0	0.580 ^a	+0.054	0.583
	Adenocarcinoma	91	68.4 $\pm$ 126.7			
Tumor "T" stage	T1	18	42.4 $\pm$ 152.1	0.195 ^b	+0.057	0.578
	T2	36	70.4 $\pm$ 119.8			
	T3	16	40.7 $\pm$ 33.9			
	T4	29	81.0 $\pm$ 130.5			
	Missing (Tx)	7				
Node "N" stage	N0	29	70.0 $\pm$ 123.0	0.536 ^b	−0.014	0.895
	N1	10	114.6 $\pm$ 339.8			
	N2	37	49.1 $\pm$ 52.0			
	N3	21	124.3 $\pm$ 187.7			
	Missing (Nx)	9				
Metastatic "M" stage	M0	27	34.7 $\pm$ 25.0	0.001 ^a	+0.313	0.001
	M1	78	92.3 $\pm$ 128.0			
	Missing	1				
Number of metastatic sites	0	27	34.7 $\pm$ 25.0	0.003 ^b	+0.322	0.001
	1	33	69.7 $\pm$ 146.1			
	2+	44	103.0 $\pm$ 117.8			
	Missing	2				
TNM stage	Stage I–II	13	32.6 $\pm$ 170.9	0.002 ^b	+0.327	0.001
	Stage III	13	34.7 $\pm$ 24.0			
	Stage IV	78	92.3 $\pm$ 127.9			
	Missing	2				
Overall		106	67.1 $\pm$ 122.1	—	—	—

^aMann–Whitney *U* test.^bKruskal–Wallis one-way ANOVA test.

allows the simultaneous screening of a broad range of known hotspot mutations in a large number of samples in a cost and time effective way compatible with clinical practice. Deep sequencing (10,000X) allowed the detection of mutations with frequencies as low as 0.2% in cfDNA. However, the manufactured PGM variant caller was not designed to call low abundant mutations diluted in wild-type genomic DNA (30). We thus had to use an in-house variant calling strategy, which improved the overall sensitivity from 16% (ITVC approach for all amplicons together) to 58% (Supplementary Table S6). This limitation of the manufacturer variant caller should be addressed in the future by dedicated software to allow the implementation of the test in clinical settings. Accurate detection of insertions and deletions is another limitation of NGS technologies, including the IonTorrent PGM (31). Given that the expected deletions and insertions were of defined size and location, they could be unequivocally detected with IGV, even those with an allele frequency as low as 0.2%. However, we found a trend for a lower detection rate of insertions/deletions compared with point mutations. This may be due to the

principle of the technology that may fail to properly align reads to the reference genome in the presence of insertions or deletions. Using a NGS technology that uses paired-end sequencing may improve the detection of insertions/deletions in this setting. However, this would need to be investigated in a dedicated study directly comparing such technology with IonTorrent.

Several studies have previously investigated the potential use of cfDNA for the noninvasive detection of diagnostic biomarkers in lung cancer using various methods (Table 5). However, most have focused only on one biomarker and included small series of patients. In addition, the majority has only included advanced stages (IIIB/IV). The reported sensitivity of these studies ranged from 36% to 100%, and the specificity from 80% to 100%. Our results are thus consistent with those previously published in the field. However, our method has the advantage to assess several biomarkers simultaneously and to be easily scalable to a higher number of biomarkers.

Only a handful of studies have used NGS technologies for the detection of tumor somatic mutations in body fluids (22, 23, 32–34). Narayan and colleagues, for example,

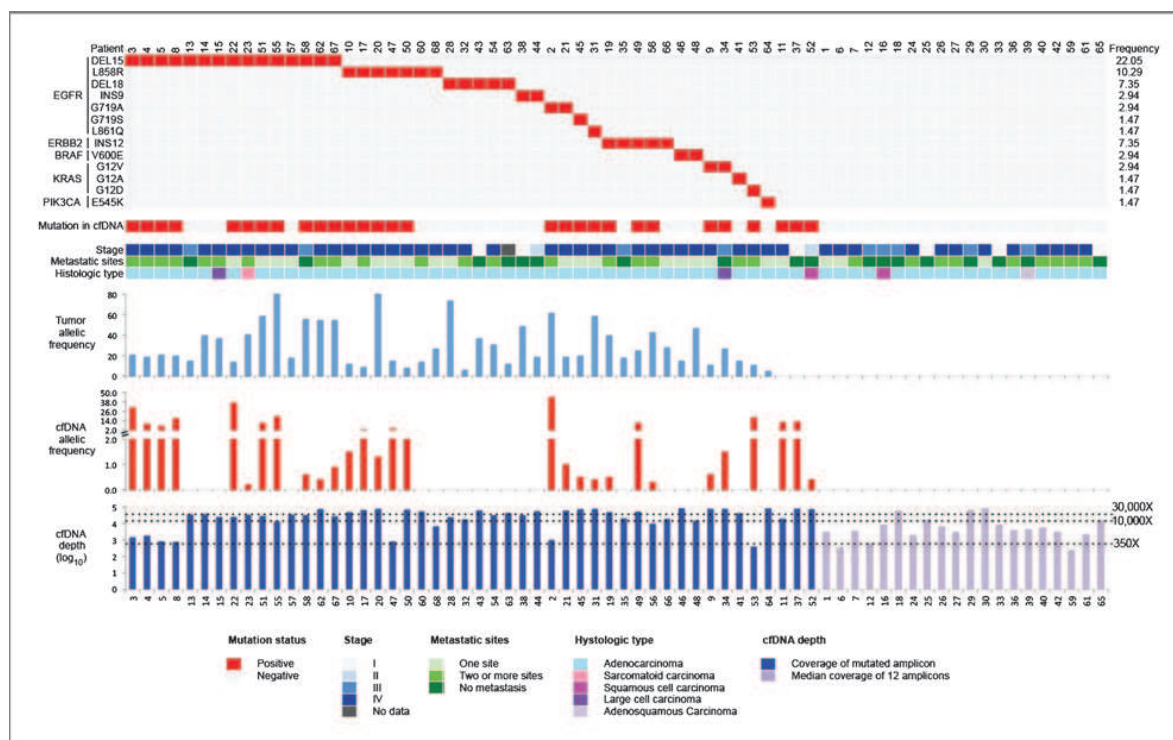


Figure 1. Summary results of NGS sequencing for all matched samples ($n = 68$). Top frequency chart, details of mutations found in tumors in each specific sample. (Red dot indicates mutated samples). Middle frequency chart, cfDNA samples positive for the tumor somatic mutation indicated in top panel. Bottom frequency chart, clinical characteristics of the tumors. Top bar graph, allelic frequency of mutation in tDNA. Middle bar graph, allelic frequency of mutation in cfDNA. Bottom bar graph, total coverage at the position of the mutation in cfDNA or median coverage of all amplicons in wild-type samples.

showed that a deep-sequencing approach can be an appropriate strategy for the detection of low abundant point mutations in surrogate tissues (32). Our work, assessing a larger panel of mutations, including both point mutations and insertions/deletions, and performed on a larger series of patients, further supports and extends the applicability of the NGS for the detection of aberrant genetic events in cfDNA.

In the present study, two *EGFR* and one *PIK3CA* hot-spot mutations were detected in cfDNA but were not called in tDNA. Two of these mutations were found at a 4% allelic fraction in tDNA by manual inspection with IGV. We have set a 5% allelic fraction threshold for calling variant in tDNA to look for mutations representative of the tumor content. Results on these samples suggest that mutations poorly represented in tDNA can still be found in cfDNA. However, it is also possible that the analyzed tumor biopsy was not representative of the tumor content (sampling bias). Indeed, recent findings provide strong evidence that a tumor may host different subclonal populations carrying distinct somatic mutation profiles (35, 36). This point is particularly critical for the molecular analysis of small biopsies (36). Some studies have isolated circulating tumor cells to detect tumor-specific molecular alterations (37, 38). Although this approach

would require less sensitive techniques for detecting relevant mutations, it may have the same drawback as biopsies because these cells may also represent a limited set of subclones of the tumor. Therefore, applying highly sensitive NGS-based techniques on cfDNA (that may come from different tumor subpopulations) may provide a better assessment of the spectrum of alterations present in the entire tumor. However, this hypothesis remains to be tested. Indeed intra-tumor heterogeneity about *EGFR* remains controversial, as a recent study suggested that heterogeneous distribution of *EGFR* mutations is extremely rare and may simply be artefacts due to differences in *EGFR* DNA sequences amplification (39).

In some samples, tumor mutations could not be detected in cfDNA even if the coverage obtained for the amplicons carrying the expected mutation was high (13 samples had above 30,000X coverage, including 5 samples above 60,000X). In other cases, some mutations were detected in cfDNA while the obtained coverage was low (between 400X and 800X). Thus, although high sensitivity allows the detection of low abundant mutations, parameters related to the tumor biology may be the most important factors influencing the capacity to detect tumor mutation in cfDNA. Our results show that metastatic stage is one major factor. Stage IV cases have

Table 3. IonTorrent NGS test on cfDNA properties for each individual amplicon and overall, using tDNA for reference in all matched samples ($n = 68$)

	<i>n</i>	cfDNA+		cfDNA–		Mutation detection rate (sensitivity)	Concordance rate
		tDNA+	tDNA–	tDNA–	tDNA+		
PI3KCA exon 9	61		1	59	1	—	97%
PI3KCA exon 20	60			60		—	100%
EGFR exon 18	59	3		56		100%	100%
EGFR exon 19	59	11	2	37	9	55%	81%
EGFR exon 20	60			58	2	—	97%
EGFR exon 21	61	6		53	2	75%	97%
BRAF exon 11	60			60		—	100%
BRAF exon 15	61			58	3	—	95%
KRAS exon 2	59	3		55	1	75%	98%
KRAS exon 3	58			58		—	100%
ERBB2 exon 19	59			59		—	100%
ERBB2 exon 20	63	3		58	2	60%	97%
Overall (95%CI; all patients, at least one amplicon)	68	26	3	20	19	58% (43%; 71%)	68% (56%; 78%)
All 12 amplicons together (95% CI)	56	21	3	16	16	57% (41%; 71%)	66% (53%; 77%)

Abbreviations: cfDNA+, mutation in detected in cfDNA; cfDNA–, no mutation detected in cfDNA; tDNA+, mutation detected in tDNA; tDNA–, no mutation detected in tDNA.

higher concentration of cfDNA. These results suggest that a part of cfDNA may come from metastatic sites and that cfDNA reflects the tumor burden. However, the origin of cfDNA is still poorly understood and further studies would be needed to fully address this question.

A possible limitation of our study resides in suboptimal cfDNA samples. Indeed, the BioCAST study protocol allowed storage of blood samples at room temperature for up to 24 hours before plasma isolation. Thus, plasma DNA may have been contaminated with genomic DNA

Table 4. NGS test specificity estimate for each individual amplicon and overall, using tDNA for reference

	<i>n</i>	cfDNA+		cfDNA–		Specificity
		tDNA+	tDNA–	tDNA–	tDNA+	
PI3KCA exon 9	7		1	6		86%
PI3KCA exon 20	6			6		100%
EGFR exon 18	8	2		6		100%
EGFR exon 19	33	7	2	15	9	88%
EGFR exon 20	13			11	2	100%
EGFR exon 21	18	3		13	1	100%
BRAF exon 11	8			8		100%
BRAF exon 15	31			29	2	100%
KRAS exon 2	9	2		6	1	100%
KRAS exon 3	6			6		100%
ERBB2 exon 19	6			6		100%
ERBB2 exon 20	28	3		23	2	100%
Overall (95%CI; all patients, at least one amplicon)	51	17	2	13	19	87% (62%; 96%)

NOTE: This analysis was restricted to paired samples for which deep sequencing with the coverage reached at least 50X in tDNA and 10000X in cfDNA ($n = 51$).

Abbreviations: cfDNA+, mutation in detected in cfDNA; cfDNA–, no mutation detected in cfDNA; tDNA+, mutation detected in tDNA; tDNA–, no mutation detected in tDNA.

Table 5. Main results of studies that have focused on cfDNA as a biomarker for noninvasive diagnosis of lung cancers

Reference	Comparison with tDNA	Biomarker tested	Stage	N paired sample	N mutated in tumor	Mutation diagnosis technique	Sen	Spe	Conc
Kimura et al. (41).	Y	EGFR	IV	42	8	Tissue: direct sequencing Blood: direct sequencing and Scorpion ARMS	75%	97%	93%
Rosell et al. (42).	Y	EGFR	IV	164	164	Taqman assay	59%	NC ^a	59%
Kuang et al. (17).	Y	EGFR T790M	IIIB/IV	43	30	Scorpion ARMS + direct sequencing	70%	85%	74%
Wang et al. (43)	Y	KRAS	IIIB/IV	273	30	RFLP	77%	95%	93%
Taniguchi et al. (16)	Y	EGFR	IV	44	44	BEAMing	72%	NC ^a	73%
Jian et al. (44)	N	EGFR	IIIB/IV	56	22	Taqman assay	—	—	—
Nakamura et al. (14)	N	EGFR T790M	IIIB/IV	49	—	MPB-QP	—	—	—
Goto et al. (19)	Y	EGFR	IIIB/IV	86	51	Scorpion ARMS	43%	100%	66%
Yam et al. (15)	Y	EGFR	IIIB/IV	37	32	Taqman assay	100%	80%	97%
Narayan et al. (32)	Y	KRAS (EGFR, BRAF)	I-IV	21	6 (KRAS)	NGS (Illumina HiSeq2000)	100%	100%	100%
Nygaard et al. (45)	Y	KRAS	II to IV	10	10	Inhouse qPCR method	90%	NC ^a	90%
Zhao et al. (20)	Y	EGFR (L858R and del19)	I to IV	111	45	Mutant-enriched PCR	36%	95%	71%
Sakai et al. (46)	N	EGFR T790M	IV	75	21	SABER	—	—	—
Mok et al. (47)	Y	EGFR (del19, L858R and G719X)	IIIB/IV	224	89	Allelic-specific cobas PCR	76%	96%	88%
Kim et al. (48)	Y	EGFR (L858R and del19)	IIIB/IV	40	6	PNAClamp EGFR mutation Detection kit	55%	100%	88%
Douillard et al. (49)	Y	EGFR (del19, L858R, T790M)	IIIB/IV	652	105	Scorpion ARMS	66%	100%	94%
Oxnard et al. (50)	Y	EGFR L858R/EGFR del19/KRAS G12C	—	23/23/31	12/9/14	Droplet Digital PCR	67%/67%/71%	100%/100%/100%	83%/87%/87%
IARC/ICT	Y	EGFR, KRAS, BRAF, ERBB2, PI3KCA	I to IV	67	50	NGS (IonTorrent PGM)	58%	87%	68%

Abbreviations: NC, not computable; NR, not reported; SABER, highly sensitive single allele base extension reaction; RFLP, restriction fragment length polymorphism; MBP-QP, mutation-biased PCR quenching probe; Sen, sensitivity; Spe, specificity; Conc, concordance rate.

^aAll included are mutated.

released from necrotic white blood cells, resulting in the dilution of tDNA in plasma, negatively affecting the detection of tumor mutations in cfDNA (10). This contamination with genomic DNA could also explain the absence of correlation between mutation allelic frequency in the tumor and mutation detection rate in cfDNA or mutation allelic frequency in plasma. Nonetheless, the detection rate obtained in these suboptimal conditions shows the potential of this approach in samples obtained in more controlled clinical settings. Indeed, plasma sample quality could be easily addressed in future cohorts by processing (centrifuging and freezing) samples within 3 hours after blood collection, which is achievable in routine clinical settings (40).

One of the strengths of our study is that the analyzed never-smoker population carries a high frequency of actionable mutations of various types that represent the most relevant driver mutations in the field of thoracic oncology. We were thus able to test our NGS IonTorrent PGM platform approach on a panel of deletions, insertions, and point mutations (12 hotspot regions targeting five genes) that have not been evaluated in other cfDNA-based studies.

In conclusion, we showed that targeted NGS with the IonTorrent platform for the detection of tumor mutations in cfDNA is applicable to clinical samples in lung cancer. The assay could therefore be a good alternative for initial molecular diagnosis when the obtained histologic sample is poor and could be used as a noninvasive test for assessing regularly the efficacy of targeted therapy by monitoring mutations in blood. Further studies on prospective validation cohorts are required to determine whether an optimized version of the assay may be applicable in routine clinical practice.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

S. Couraud is a consultant/advisory board member for AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, and Roche. G. Zalcman is a consultant/advisory board member for AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, Bristol-Myers

Squibb, Eli Lilly, Pfizer, and Roche. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Disclaimer

The funding sources had no role in the design, analysis, and interpretation of the results, and thus, the authors were independent from the funding source.

Authors' Contributions

Conception and design: S. Couraud, F. Vaca-Paniagua, H. Blanché, N. Girard, J. Trédaniel, M. Vincent, F. Morin, M. Olivier

Development of methodology: S. Couraud, F. Vaca-Paniagua, S. Villar, J. Oliver, N. Girard, M. Vincent, J. McKay, F. Morin, M. Olivier

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): S. Couraud, F. Vaca-Paniagua, S. Villar, H. Blanché, J. Trédaniel, L. Guilleminault, R. Gervais, N. Prim, M. Vincent, S. Larivé, P. Foucher, B. Duvert, F. Le Calvez-Kelm, J. McKay, F. Morin, M. Olivier, P.-J. Souquet

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): S. Couraud, F. Vaca-Paniagua, S. Villar, J. Oliver, T. Schuster, N. Girard, M. Vallee, F. Le Calvez-Kelm, J. McKay, G. Zalcman, M. Olivier, P.-J. Souquet

Writing, review, and/or revision of the manuscript: S. Couraud, F. Vaca-Paniagua, S. Villar, J. Oliver, T. Schuster, N. Girard, J. Trédaniel, L. Guilleminault, N. Prim, M. Vincent, J. Margery, S. Larivé, P. Foucher, M. Vallee, F. Le Calvez-Kelm, F. Morin, G. Zalcman, M. Olivier, P.-J. Souquet

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): S. Couraud, N. Girard, P. Missy, F. Morin, G. Zalcman

Study supervision: S. Couraud, F. Vaca-Paniagua, N. Girard, P. Missy, F. Morin, G. Zalcman, M. Olivier

Other (organization and management of the collection of biologic samples): H. Blanché

Acknowledgments

The authors thank Stéphanie Labonne and William Lebossé, who were involved in the BioCAST study as senior and junior project managers, respectively.

Grant Support

The BioCAST/IFCT-1002 study was supported by research grants from AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, Eli Lilly, Pierre-Fabre, Pfizer, and Roche. This work was also supported by CONACyT 169082 (to F. Vaca-Paniagua).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received November 12, 2013; revised May 21, 2014; accepted June 17, 2014; published OnlineFirst July 10, 2014.

References

- Cardarella S, Ortiz TM, Joshi VA, Butaney M, Jackman DM, Kwiatkowski DJ, et al. The introduction of systematic genomic testing for patients with non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012;7:1767-74.
- Nowak F, Soria J-C, Calvo F. Tumour molecular profiling for deciding therapy—the French initiative. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9:479-86.
- Couraud S, Zalcman G, Milleron B, Morin F, Souquet P-J. Lung cancer in never smokers—a review. *Eur J Cancer* 2012;48:1299-311.
- Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, Yang C-H, Chu D-T, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin–paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:947-57.
- Zhou C, Wu Y-L, Chen G, Feng J, Liu X-Q, Wang C, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2011;12:735-42.
- Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EORTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;13:239-46.
- Yang JC-H, Shih J-Y, Su W-C, Hsia T-C, Tsai C-M, Ou S-HI, et al. Afatinib for patients with lung adenocarcinoma and epidermal growth factor receptor mutations (LUX-Lung 2): a phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2012;13:539-48.
- Thunnissen E, Kerr KM, Herth FJF, Lantuejoul S, Papotti M, Rintoul RC, et al. The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples. Practical approach of a working group. *Lung Cancer* 2012;76:1-18.
- Travis WD, Rekhtman N, Riley GJ, Geisinger KR, Asamura H, Brambilla E, et al. Pathologic diagnosis of advanced lung cancer based on small biopsies and cytology: a paradigm shift. *J Thorac Oncol* 2010;5:411-4.

10. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011;11:426–37.
11. Perkins G, Yap TA, Pope L, Cassidy AM, Dukes JP, Riisnaes R, et al. Multi-purpose utility of circulating plasma DNA testing in patients with advanced cancers. *PLoS ONE* 2012;7:e47020.
12. Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013;68:1199–209.
13. Lee YJ, Yoon K-A, Han J-Y, Kim HT, Yun T, Lee GK, et al. Circulating cell-free DNA in plasma of never smokers with advanced lung adenocarcinoma receiving gefitinib or standard chemotherapy as first-line therapy. *Clin Cancer Res* 2011;17:5179–87.
14. Nakamura T, Sueoka-Aragane N, Iwanaga K, Sato A, Komiya K, Abe T, et al. A noninvasive system for monitoring resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors with plasma DNA. *J Thorac Oncol* 2011;6:1639–48.
15. Yam I, Lam DC-L, Chan K, Chung-Man Ho J, Ip M, Lam W-K, et al. EGFR array: uses in the detection of plasma EGFR mutations in non-small cell lung cancer patients. *J Thorac Oncol* 2012;7:1131–40.
16. Taniguchi K, Uchida J, Nishino K, Kumagai T, Okuyama T, Okami J, et al. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2011;17:7808–15.
17. Kuang Y, Rogers A, Yeap BY, Wang L, Makrigiorgos M, Vetrant K, et al. Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:2630–6.
18. Ramirez JL, Sarries C, de Castro PL, Roig B, Queralt C, Escuin D, et al. Methylation patterns and K-ras mutations in tumor and paired serum of resected non-small-cell lung cancer patients. *Cancer Lett* 2003;193:207–16.
19. Goto K, Ichinose Y, Ohe Y, Yamamoto N, Negoro S, Nishio K, et al. Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum: from IPASS, a phase III study of gefitinib or carboplatin/paclitaxel in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012;7:115–21.
20. Zhao X, Han R-B, Zhao J, Wang J, Yang F, Zhong W, et al. Comparison of epidermal growth factor receptor mutation statuses in tissue and plasma in stage I-IV non-small cell lung cancer patients. *Respiration* 2013;85:119–25.
21. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008;14:985–90.
22. Chan KCA, Jiang P, Zheng YWL, Liao GJW, Sun H, Wong J, et al. Cancer genome scanning in plasma: detection of tumor-associated copy number aberrations, single-nucleotide variants, and tumoral heterogeneity by massively parallel sequencing. *Clin Chem* 2013;59:211–24.
23. Tran B, Brown AMK, Bedard PL, Winquist E, Goss GD, Hotte SJ, et al. Feasibility of real time next generation sequencing of cancer genes linked to drug response: results from a clinical trial. *Int J Cancer* 2013;132:1547–55.
24. Couraud S, Labonne S, Missy P, Morin F, Tran Qu, Deroy A, et al. [Lung cancer in never smokers: a French national cohort (BioCAST/IFCT-1002)]. *Rev Mal Respir* 2013;30:576–83.
25. Beau-Faller M, Blons H, Domerg C, Gajda D, Richard N, Escande F, et al. A multicenter blinded study evaluating EGFR and KRAS mutation testing methods in the clinical non-small cell lung cancer setting-IFCT/ERMETIC2 Project Part 1: Comparison of testing methods in 20 French molecular genetic National Cancer Institute platforms. *J Mol Diagn* 2014;16:45–55.
26. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 2012;40:e115.
27. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2010;38:e164.
28. Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* 2013;14:178–92.
29. Saville DJ. Multiple comparison procedures: the practical solution. *American Statistician* 1990;44:174–80.
30. Stead LF, Sutton KM, Taylor GR, Quirke P, Rabbitts P. Accurately identifying low-allelic fraction variants in single samples with next-generation sequencing: applications in tumor subclone resolution. *Hum Mutat* 2013;34:1432–8.
31. Bragg LM, Stone G, Butler MK, Hugenholtz P, Tyson GW. Shining a light on dark sequencing: characterising errors in Ion Torrent PGM data. *PLoS Comput Biol* 2013;9:e1003031.
32. Narayan A, Carriero NJ, Gettinger SN, Kluytenaar J, Kozak KR, Yock TI, et al. Ultrasensitive measurement of hotspot mutations in tumor DNA in blood using error-suppressed multiplexed deep sequencing. *Cancer Res* 2012;72:3492–8.
33. Murtaza M, Dawson S-J, Tsui DWY, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 2013;497:108–12.
34. Leary RJ, Sausen M, Kinde I, Papadopoulos N, Carpten JD, Craig D, et al. Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing. *Sci Transl Med* 2012;4:162ra154.
35. Fisher R, Pusztai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br J Cancer* 2013;108:479–85.
36. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883–92.
37. Pailler E, Adam J, Barthélémy A, Oulhen M, Auger N, Valent A, et al. Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013;31:2273–81.
38. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ullus L, Brannigan B, Collura CV, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008;359:366–77.
39. Yatabe Y, Matsuo K, Mitsudomi T. Heterogeneous distribution of EGFR mutations is extremely rare in lung adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2011;29:2972–7.
40. Vallée A, Marq M, Bizieux A, Kouri CE, Lacroix H, Bennouna J, et al. Plasma is a better source of tumor-derived circulating cell-free DNA than serum for the detection of EGFR alterations in lung tumor patients. *Lung Cancer* 2013;82:373–4.
41. Kimura H, Suminoe M, Kasahara K, Sone T, Araya T, Tamori S, et al. Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA). *Br J Cancer* 2007;97:778–84.
42. Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 2009;361:958–67.
43. Wang S, An T, Wang J, Zhao J, Wang Z, Zhuo M, et al. Potential clinical significance of a plasma-based KRAS mutation analysis in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:1324–30.
44. Jian G, Songwen Z, Ling Z, Qinfang D, Jie Z, Liang T, et al. Prediction of epidermal growth factor receptor mutations in the plasma/pleural effusion to efficacy of gefitinib treatment in advanced non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010;136:1341–7.
45. Nygaard AD, Garm Spindler K-L, Pallisgaard N, Andersen RF, Jakobsen A. The prognostic value of KRAS mutated plasma DNA in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2013;79:312–7.
46. Sakai K, Horiike A, Irwin DL, Kudo K, Fujita Y, Tanimoto A, et al. Detection of epidermal growth factor receptor T790M mutation in plasma DNA from patients refractory to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Sci* 2013;104:1198–204.
47. Mok TS, Wu YL, Lee JS, Yu C-J, Siu-ranpong V, Wen W, et al. Detection of EGFR-activating mutations from plasma DNA as a potent predictor of survival outcomes in FASTACT 2: a randomized phase III study on intercalated combination of erlotinib (E) and chemotherapy (C). *J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr 8021).

Couraud et al.

48. Kim H-R, Lee SY, Hyun D-S, Lee MK, Lee H-K, Choi C-M, et al. Detection of EGFR mutations in circulating free DNA by PNA-mediated PCR clamping. *J Exp Clin Cancer Res* 2013; 32:50.
49. Douillard J-Y, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, McCormack R, Webster A, et al. First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *Br J Cancer* 2014;110:55–62.
50. Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, Mach SL, O'Connell A, Messineo MM, et al. Noninvasive detection of response and resistance in EGFR mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin Cancer Res* 2014;20:1–8.

SUPPLEMENTAL FILES

Supplemental Figure S1. Sample inclusion flow chart.

Supplemental Figure S2. Boxplot of circulating free DNA concentration in plasma (in ng/μl) regarding M stage (up), and number of metastatic sites (down) in all samples (n=106). Y axis is in logarithmic scale.

Supplemental Table S1. Processes used in the different participating labs for tumor DNA extraction, storage, shipment, and biomarker analysis.

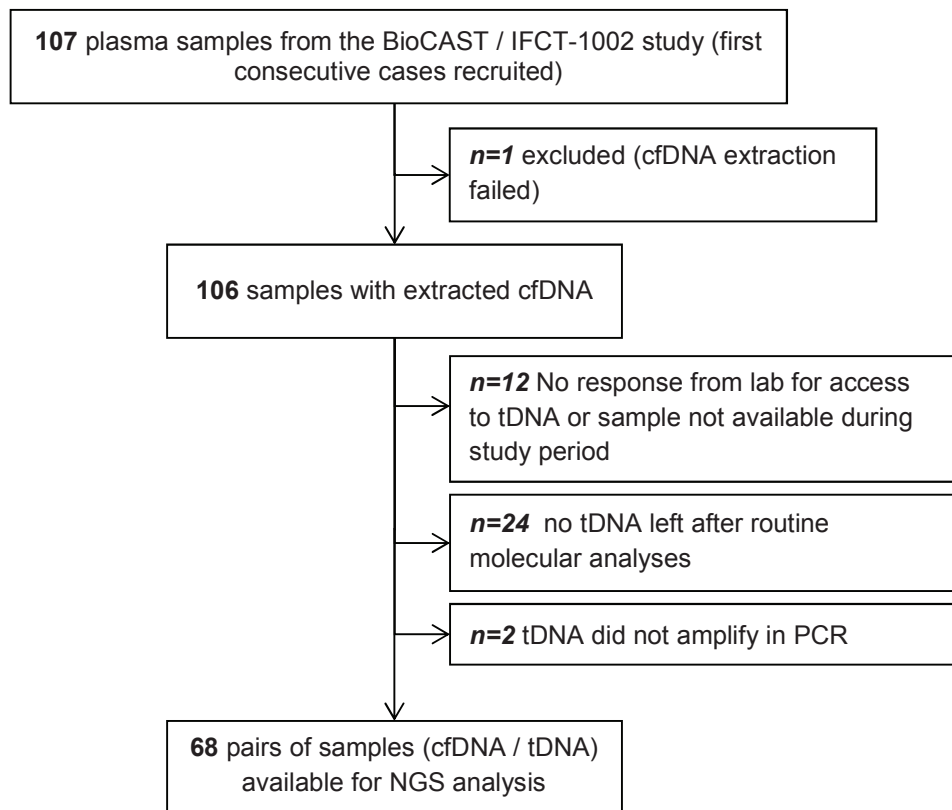
Supplemental Table S2. Primers used for amplicon sequencing by IonTorrent next-generation sequencing

Supplemental Table S3. Multiplex reaction conditions.

Supplemental Table S4. NGS mutation screening results in the 68 paired samples

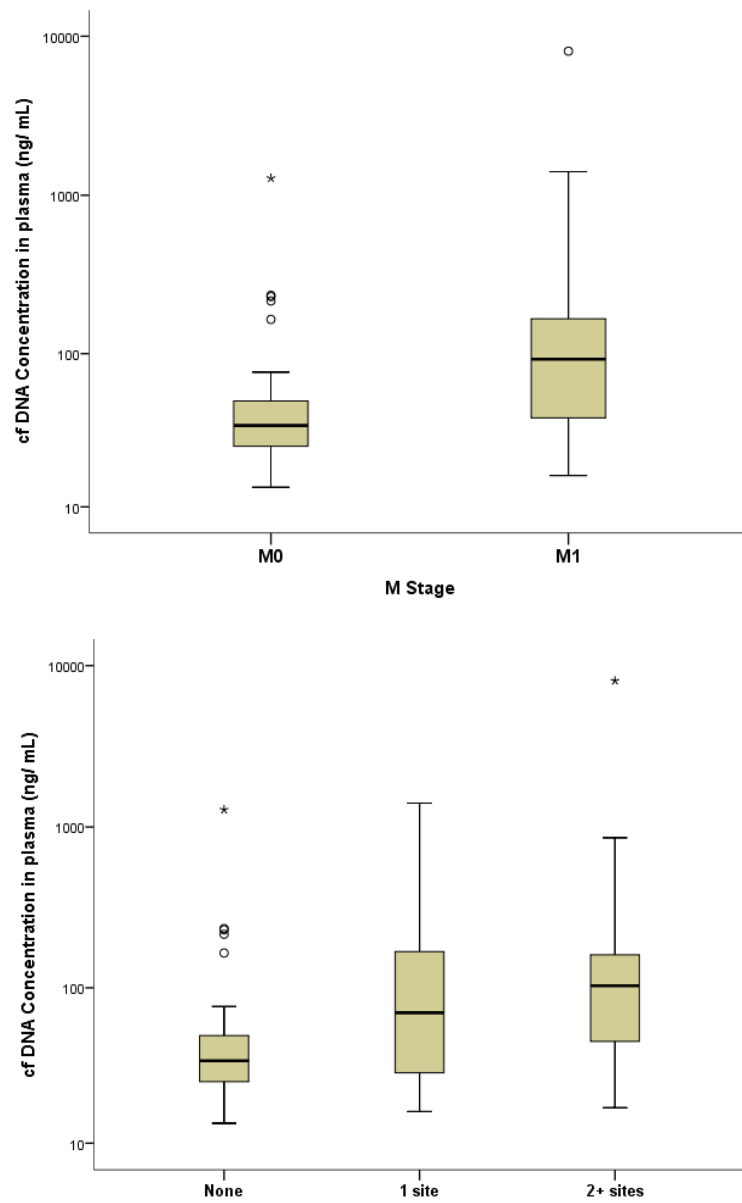
Supplemental Table S5. IonTorrent NGS test results in cfDNA, for each individual amplicon and overall, taking tDNA as a reference and restricted to stage IV samples (n=50)

Supplemental Table S6. NGS test results in tDNA and cfDNA for all amplicons concomitantly using the ITVC strategy (5A), or the in-house strategy (5B); and corresponding calculated sensitivity for all matched samples analyzed by NGS (n=68)



Supplemental Figure S1. Sample inclusion flow chart

cfDNA: Circulating Free DNA; tDNA: tumoral DNA; NGS: Next-Generation Sequencing



Supplemental Figure S2. Boxplot of circulating free DNA concentration in plasma (in ng/ μ l) regarding M stage (up), and number of metastatic sites (down) in all samples (n=106). Y axis is in logarithmic scale.

Supplemental Table S1. Processes used in each participating labs for tumor DNA extraction, storage, shipping, and biomarker analysis.

Lab	n	%	micro-dissection	DNA extraction	Storage	Shipping	EGFR	KRAS	HER2	BRAF	PI3KCA
L1	1	1%	No	FFPE DNA tissu kit (Qiagen)	-20°C	RT	RT-PCR	Pyroseq	RFLP	Pyroseq	
L2	1	1%	Yes	NucleoSpin FFPE DNA (Macherey-Nagel)	-20°C	RT	PCR Taqman (exons18,20,21) + RFLP (exon19)	PCR snapshot	RFLP	PCR snapshot	PCR snapshot
L3	1	1%	Yes	EZ1 DNA kit (Qiagen)	-20°C	RT	RFLP (exon 19+20) + PCR Taqman (L858R) + HRM / Sequencing (exon 18)	HRM / Taqman	HRM / Sequencing	HRM / Taqman (V600x)	
L4	1	1%			-20°C	F	Sequencing	HRM		HRM	
L5	1	1%	No	QIAamp DNA micro kit (Qiagen)	-20°C	RT	Sequencing (19 à 21) + PCR Taqman (exon 18, 20, 21) + RFLP (exon 19)	PCR Taqman	Sequencing	PCR Taqman	
L6	1	1%	No	QIAamp DNA micro kit (Qiagen)	-20°C	RT	Pyroseq	PCR Taqman	Pyroseq	Pyroseq	Pyroseq
L7	2	3%	No	iPrep instrument (Life technologies)	-20°C	RT	Allele specific PCR	Sanger Sequencing		Allele specific PCR	
L8	2	3%	Yes	Maxwell 16 FFPE Plus LEV DNA purification kit (Promega, Ref AS1135)	-20°C	RT	PCR Taqman (exons 18,20,21) + RFLP (exons 19,20)	PCR Taqman	RFLP	PCR Taqman	PCR Taqman
L9	2	3%			-20°C	F					
L10	3	4%		Magtration PLC (Bionobis)	-20°C	RT	Pyroseq (exon 18, 20, 21) + RFLP (19, 20)	Pyroseq		Pyroseq	
L11	3	4%	No	Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit (Promega)	-20°C	RT	HRM + Pyroseq	HRM + pyroseq	HRM+ Sanger Pyroseq	HRM + pyroseq	HRM + Pyroseq
L12	4	6%			-20°C	F	Pyroseq	Pyroseq	Pyroseq	Pyroseq	Pyro seq
L13	4	6%	No	Easymag (Biomerieux)	+4°C	RT	HRM +séquençage	PCR Taqman		HRM +séquençage	
L14	4	6%	No	QIAamp DNA micro kit (Qiagen)	-80°C	F	Sequencing	PCR snapshot	Fragment analysis	PCR snapshot	PCR Snapshot

L15	4	6%		-20°C	RT	Sequencing + RFLP (exon 19) + PCR Taqman (exon 20)	PCR Taqman	RFLP	
L16	6	9%	No	-20°C	F	Fragment analysis (exons 19 and 20); Fret+PNA (exon 21 - L858R); Sequencing (others)	Fret+PNA	Fragment analysis	Fret Sequencing
L17	7	10%		-20°C	RT	PCR Taqman	PCR Scorpio		PCR Taqman
L18	21	31%	Yes	-20°C	RT	Sequencing	PCR snapshot	Sequencing	Sequencing

Pyroseq – Pyrosequencing; HRM - High Resolution Melting; RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism; (RT)PCR - (Real Time)

Polymerase Chain Reaction; RT - Room temperature; F – Frozen; Fret + PNA - Förster resonance energy transfer donor for the detection of DNA hybridization in conjunction with a fluorescein-labeled pyrrolidyl peptide nucleic acid (PNA) probe.

Supplemental Table S2. Primers used for amplicon sequencing by IonTorrent next-generation sequencing

Gene	Exon	Genomic region	Codons	Primer	Sequence	Amplicon size (bp)
EGFR	18	chr7: 55241636-55241755	696-728	EGFR18v2F	GTGGAGAAGCTCCCAACCAA	120
				EGFR18v2R	CCTGTGCCAGGGACCTTAC	
	19	chr7: 55242381-55242537	729-761	EGFR19F	GCCAGTTAACGTCTTCCTTCT	157
				EGFR19R	CCACACAGCAAAGCAGAAAC	
	20	chr7: 55248968-55249092	762-796	EGFR20F	GCCTCTCCCTCCCTCCAG	125
				EGFR20v2R	CAGCCGAAGGGCATGAGC	
KRAS	2	chr12: 25398216-25398329	1-38	KRAS2v2F	GCCTGCTGAAAATGACTGAA	114
				KRAS2v2R	TTGGATCATATTCGTCCACAA	
	3	chr12: 25380220-25380317	48-79	KRAS3v2F	TGAGAGAAACCTGTCTCTTGGA	98
				KRAS3v2R	AAAGAAAGCCCTCCCCAGT	
BRAF	11	chr7: 140481373-140481480	444-478	BRAF11v2F	GACGGGACTCGAGTGATGAT	108
				BRAF11v2R	TACCATGCCACTTTCCCTTG	
	15	chr7: 140453078-140453180	586-619	BRAF15v2F	TGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTG	103
				BRAF15v2R	CCACAAAATGGATCCAGACA	
HER2/ ERBB2	19	chr17: 37880177-37880282	741-769	HER2-19v2F	CCTGATGGGGAGAATGTGAA	106
				HER2-19v2R	AGAGGGTGGAGGGGCTTAC	
	20	chr17: 37880963-37881061	769-796	HER2-20v2F	GTACCCCTTGTCCTCCAGGAAG	99
				HER2-20v2R	ACCAGCTGCACCGTGGATGT	
PIK3CA	9	chr3: 178936029-178936130	525-555	PIK3AC9v2F	GGGAAAATGACAAAGAACAGC	102
				PIK3CA9v2R	GCACTTACCTGTGACTCCATAGAA	
	20	chr3: 178952038-178952142	1039-1058	PIK3AC20v2F	TGAGCAAGAGGCTTTGGAGT	105
				PIK3CA20v2R	GCATGCTGTTTAATTGTGTGG	

Supplemental Table S3. Multiplex reaction conditions.

Product	Volume (μL)
Multiplex#1	
5X PCR buffer without MgCl ₂	4
25mM MgCl ₂	1.2
dNTP mix (final 0.4mM)	1.6
PIK3AC20v2F (0.4 μM final)	0.8
PIK3CA20v2R (0.4 μM final)	0.8
EGFR21v2F (0.4 μM final)	0.8
EGFR21v2R (0.4 μM final)	0.8
ERBB2-19v2F (0.8 μM final)*	1.6
ERBB2-19v2R (0.8 μM final)*	1.6
GoTaq HotStart DNA polymerase (5U/μl)	0.1
Template DNA	4
Water, molecular biology grade	2.7
Total	20
Multiplex#2	
5X PCR buffer without MgCl ₂	4
25mM MgCl ₂	1.2
dNTP mix (final 0.4mM)	1.6
HER2-20v2F (0.4 μM final)	0.8
HER2-20v2R (0.4 μM final)	0.8
EGFR18v2F (0.8 μM final)	1.2
EGFR18v2R (0.8 μM final)	1.2
EGFR19F (0.8 μM final)	0.8
EGFR19R (0.8 μM final)	0.8
GoTaq HotStart DNA polymerase (5U/μl)	0.1
Template DNA	4
Water, molecular biology grade	1.1
Total	20
Multiplex#3	
5X PCR buffer without MgCl ₂	4
25mM MgCl ₂	1.2
dNTP mix (final 0.4mM)	1.6
PIK3AC9v2F (0.4 μM final)	0.8
PIK3CA9v2R (0.4 μM final)	0.8
BRAF11v2F (0.4 μM final)	0.8
BRAF11v2R (0.4 μM final)	0.8
EGFR20F (0.8 μM final)	1.6
EGFR20v2R (0.8 μM final)	1.6
GoTaq HotStart DNA polymerase (5U/μl)	0.1
Template DNA	4
Water, molecular biology grade	2.7
Total	20
Multiplex#4	
5X PCR buffer without MgCl ₂	4
25mM MgCl ₂	1.2
dNTP mix (final 0.4mM)	1.6
BRAF15v2F (0.4 μM final)	0.8
BRAF15v2R (0.4 μM final)	0.8
KRAS2v2F (0.4 μM final)	1.2
KRAS2v2R (0.4 μM final)	1.2
KRAS3v2F (0.4 μM final)	1.2
KRAS3v2R (0.4 μM final)	1.2
GoTaq HotStart DNA polymerase (5U/μl)	0.1
Template DNA	4
Water, molecular biology grade	4.3
Total	20

* ERBB2 was amplified in an independent PCR reaction in half of the samples.

Supplemental Table S4. Mutation screening results in the 68 paired samples

	Stage IV	Gene	Mutation description	Tum Freq (%)	Cf DNA Freq (%)	Cf DNA cov	ITVC	N ampl tested	Median cov on all tested ampl
#1	Y	WT						12	3079
#2	Y	EGFR	chr7:55241708G>C; ENST00000344576:c.2156G>C; p.G719A	62	44	1007	Y	12	1103
#3	Y	EGFR	chr7:55242464del15; ENST00000344576:c.2234_2248del; p.K745_A750del	21	31	1431	Y	12	1273
#4	Y	EGFR	chr7:55242464del15; ENST00000344576:c.2234_2248del; p.K745_A750del	19	10	1854		12	809
#5	Y	EGFR	chr7:55242464del15; ENST00000344576:c.2234_2248del; p.K745_A750del	21	7	833		12	478
#6	Y	WT						12	352
#7	Y	WT						11	3380
#8	Y	EGFR	chr7:55242465del15;ENST00000344576:c.2235_2249del;p.K746_A750del	20	17	761		12	475
#9	Y	KRAS	chr12:25398284C>A; ENST00000256078:c.35G>T; p.G12V	11	0.6	80113		12	541
#10	Y	EGFR	chr7:55259515T>G; ENST00000344576:c.2573T>G; p.L858R	12	1.5	611		12	405
#11	Y	EGFR	chr7:55242465del15;ENST00000344576:c.2235_2249del;p.K746_A750del	ND	12	20178		12	20283
#12		WT						12	617
#13		EGFR	chr7:55242465del15;ENST00000344576:c.2235_2249del;p.K746_A750del	15	ND	35583		12	577
#14	Y	EGFR	chr7:55242465del15;ENST00000344576:c.2235_2249del;p.K746_A750del	40	ND	37816		12	4233
#15	Y	EGFR	chr7:55242466del15; ENST00000344576:c.2236_2250del; p.E746_A750del	37	ND	25737		12	6803
#16		WT						12	8319
#17	Y	EGFR	chr7:55259515T>G; ENST00000344576:c.2573T>G; p.L858R	9	3	68047		12	401
#18		WT						1	59327
#19	Y	ERBB2	chr17:37880981ins12; ENST00000269571:c.2310_2311ins12; p.E770_A771ins12	40	0.5	51046		1	51046
#20	Y	EGFR	chr7:55259515T>G; ENST00000344576:c.2573T>G; p.L858R	83	1.3	79294		1	79294
#21	Y	EGFR	* chr7:55241708G>C; ENST00000344576:c.2156G>C; p.G719A	19	1	62516		12	1310
#22	Y	EGFR	chr7:55242464del15; ENST00000344576:c.2234_2248del; p.K745_A750del	14	37	25981	Y	12	5715
#23	Y	EGFR	chr7:55242464del15; ENST00000344576:c.2234_2248del; p.K745_A750del	41	0.2	34769		12	478
#24	Y	WT						12	1989
#25		WT						12	16611
#26	Y	WT						12	6635
#27	Y	WT						12	3095
#28	Y	EGFR	chr7:55242466del18; ENST00000344576:c.2236_2253del; p.E746_T751del	74	ND	24690		12	6619
#29		WT						1	68896
#30	Y	BRAF	chr7:140453136A>T; NM_004333:c.1799T>A; p.V600E	ND	ND			1	81003
#31	Y	EGFR	chr7:55259524T>A; ENST00000344576:c.2582T>A; p.L861Q	59	0.4	10510		12	5800
#32	Y	EGFR	chr7:55242466del18; ENST00000344576:c.2236_2253del; p.E746_T751del	6	ND	18416		12	5280
#33		WT						12	8071
#34		KRAS	chr12:25398284C>T; ENST00000256078:c.35G>A; p.G12D	27	1.5	79583		11	1012
#35		ERBB2	chr17:37880981ins12; ENST00000269571:c.2310_2311ins12; p.E770_A771ins12	18	ND	20410		12	7766
#36	Y	WT						12	3772
#37		PIK3CA	chr3:178936092A>C; NM_006218.1:c.1634A>C; p.E545A	ND	13	82722		12	606
#38		EGFR	chr7:55248998ins9; ENST00000344576:c.2296_2297ins9; p.V769_D770ins9	49	ND	33210		12	8331
#39		WT						12	4609

#40	Y	WT						12	5610
#41	Y	KRAS	chr12:25398284C>G; ENST00000256078:c.35G>C; p.G12A	15	ND	43596		12	1255
#42	Y	EGFR	chr7:55259515T>G; ENST00000344576:c.2573T>G; p.L858R	ND	ND			12	3169
#43		EGFR	chr7:55242469del18; ENST00000344576:c.2239_2256del; p.L747_S752del	37	ND	65096		12	7422
#44		EGFR	* chr7:55248998ins9; ENST00000344576:c.2296_2297ins9; p.V769_D770ins9	19	ND	57714		12	2369
#45	Y	EGFR	chr7:55241707; ENST00000344576:c.2155G>A; p.G719S	12	0.5	19361		12	20911
#46	Y	BRAF	chr7:140453136A>T; NM_004333:c.1799T>A; p.V600E	15	ND	88080		12	588
#47	Y	EGFR	chr7:55259515T>G; ENST00000344576:c.2573T>G; p.L858R	15	4	1175	Y	12	721
#48	Y	BRAF	chr7:140453136A>T; NM_004333:c.1799T>A; p.V600E	47	ND	14982		12	2341
#49	Y	ERBB2	* chr17:37880981ins12; ENST00000269571:c.2310_2311ins12; p.E770_A771ins12	25	11	52841		1	52841
#50	Y	EGFR	chr7:55259515T>G; ENST00000344576:c.2573T>G; p.L858R	8	2	72624		12	226
#51	Y	EGFR	chr7:55242464del15; ENST00000344576:c.2234_2248del; p.K745_A750del	59	11	28760	Y	12	7631
#52		EGFR	chr7:55242469del18; ENST00000344576:c.2239_2256del; p.L747_S752del	ND	0.4	76313		12	5454
#53	Y	KRAS	chr12:25398284C>T; ENST00000256078:c.35G>A; p.G12D	11	18	389	Y	12	492
#54	Y	EGFR	chr7:55242469del18; ENST00000344576:c.2239_2256del; p.L747_S752del	31	ND	32981		12	548
#55	Y	EGFR	chr7:55242464del15; ENST00000344576:c.2234_2248del; p.K745_A750del	86	19.5	13446	Y	12	3829
#56	Y	ERBB2	chr17:37880981ins12; ENST00000269571:c.2310_2311ins12; p.E770_A771ins12	43	0.3	9882		12	4219
#57	Y	EGFR	chr7:55242464del15; ENST00000344576:c.2234_2248del; p.K745_A750del	18	ND	36092		12	817
#58		EGFR	chr7:55242464del15; ENST00000344576:c.2234_2248del; p.K745_A750del	56	0.6	33098		12	561
#59	Y	WT						12	223
#60	Y	EGFR	chr7:55259515T>G; ENST00000344576:c.2573T>G; p.L858R	14	ND	55798		9	11932
#61	Y	WT						12	2036
#62	Y	EGFR	chr7:55242464del15; ENST00000344576:c.2234_2248del; p.K745_A750del	55	0.4	76559		9	7991
#63		EGFR	chr7:55242466del18; ENST00000344576:c.2236_2253del; p.E746_T751del	12	ND	44725		12	1284
#64	Y	PIK3CA	* chr3:178936091G>A; NM_006218.1:c.1633G>A; p.E545K	5	ND	84646		1	84646
#65		WT						12	15391
#66	Y	ERBB2	* chr17:37880981ins12; ENST00000269571:c.2310_2311ins12; p.E770_A771ins12	28	ND	19620		1	19620
#67	Y	EGFR	chr7:55242465del15; ENST00000344576:c.2235_2249del; p.K746_A750del	95	0.9	28373		12	18456
#68	Y	EGFR	chr7:55259515T>G; ENST00000344576:c.2573T>G; p.L858R	27	ND	86220		12	20732

* Indicates a mutation found in tDNA but that was not detected in routine analysis.

Tum - Tumor; Freq – frequency of the considered mutation; ITVC- Ion Torrent Variant Caller; Ampl - Amplicon; Cov – Coverage; WT- Wild Type; ND- Not Detected (indicates a false positive if figured in the tDNA column and a false-negative if figured in the cfDNA column); Y- Yes.

Supplemental Table S5. IonTorrent NGS test results in cfDNA, for each individual amplicon and overall, taking tDNA as a reference and restricted to stage IV samples (n=50)

	n	cfDNA+		cfDNA-		Sensitivity	Concordance rate
		tDNA+	tDNA-	tDNA-	tDNA+		
PI3KCA exon 9	45			44	1		98%
PI3KCA exon 20	44			44			100%
EGFR exon 18	43	3		40		100%	100%
EGFR exon 19	43	10	1	26	6	63%	84%
EGFR exon 20	44			44			100%
EGFR exon 21	45	6		37	2	75%	96%
BRAF exon 11	44			44			100%
BRAF exon 15	44			42	2		93%
KRAS exon 2	39	2		40	1	67%	108%
KRAS exon 3	42			42			100%
ERBB2 exon 19	44			44			100%
ERBB2 exon 20	46	3		42	1	75%	98%
Overall [95%CI]	50	24	1	12	13	65% [49%;78%]	72% [58%;83%]
All 12 amplicons together [95%CI]	41	20	1	10	10	67% [49%;81%]	73% [58%;84%]

Supplemental table S6 – NGS test results in tDNA and cfDNA for all amplicons concomitantly using the ITVC strategy (5A), or the in-house strategy (5B); and corresponding calculated sensitivity for all matched samples analyzed by NGS (n=68)

5A ITVC strategy		tDNA	
		MT	WT
cfDNA	MT	7	3
	WT	38	20
Sensitivity = 16%			

5B In house strategy		tDNA	
		MT	WT
cfDNA	MT	26	3
	WT	19	20
Sensitivity = 58%			

MT - Mutated; WT – Wild Type

XIII. CONCLUSION

L'étude BioCAST / IFCT-1002 apporte des données originales sur le cancer broncho-pulmonaire survenant chez les non-fumeurs en France. Le profil histo-clinique type est une femme, âgée, exposée au tabagisme passif durant son enfance et sa vie domestique, et atteinte d'un adénocarcinome dont le stade au diagnostic est volontiers avancé. Chez les hommes, la recherche d'exposition professionnelle devra être attentive car 35% ont une exposition certaine qu'il faut diagnostiquer et déclarer. Sur le plan moléculaire, près de trois-quarts de la population est porteuse d'une anomalie moléculaire (dont plus de la moitié de mutation EGFR), qu'il faut donc s'acharner à diagnostiquer.

Le profil moléculaire somatique est peu affecté par l'exposition aux différents facteurs de risque ou par le genre. Un âge tardif aux premières règles et une durée de vie sexuelle élevée sont respectivement responsables de significativement plus de mutations EGFR et BRAF respectivement. De plus, un âge au 1^{er} enfant élevé est un facteur de « risque » indépendant de mutation EGFR. L'exposition à l'amiante et à la silice semblent responsables d'une plus faible fréquence de mutation EGFR et d'une plus grande fréquence de mutation HER2 tandis qu'aucun réarrangement ALK n'est mis en évidence chez les patients exposés.

L'étude BioCAST n'a pas encore livré tous ses résultats. Nous travaillons en effet actuellement sur le profil moléculaire somatique en fonction de l'exposition à la pollution domestiques et aux antécédents familiaux et respiratoires personnels. De plus, nous souhaitons évaluer l'exposition à la pollution atmosphérique et au radon environnemental au travers de collaboration avec l'INERIS (L'Institut national de l'environnement industriel et des risques) et l'IRSN (Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire) respectivement. Une fois l'exposition évaluée pour chacun des individus (grâce aux codes postaux de résidence itératifs), nous pourrions également évaluer l'effet de l'exposition sur le profil moléculaire. Une fois l'ensemble des expositions aux facteurs de risques mesurées dans la cohorte, nous établirions les fractions de risques attribuables pour chacun d'entre eux (99).

L'utilisation de l'ADN circulant pour les biopsies liquides est faisable, y compris de manière multiplex. Le séquençage de nouvelle génération est un atout indéniable dans ce domaine (rapidité, profondeur d'exploration, multi-prélèvement). Il est par contre légitime de se poser la question de comparer les tests sur ADN circulant aux résultats obtenus sur l'ADN tissulaire tumoral. Ces derniers sont en effet bien souvent de très petits fragments d'une tumeur en réalité composée de plusieurs populations clonales dans un processus dynamique dans le temps et l'espace (100).

Nous envisageons d'initier rapidement la seconde phase de l'étude ancillaire, ayant pour objectif d'optimiser le test et de le valider sur l'ensemble de la série BioCAST / IFCT 1002 voire sur d'autres séries de plasma. La collection d'échantillons sanguins de BioCAST reste également unique en son genre et de nombreux projets ancillaires devraient rapidement voir le jour.

XIV. RÉFÉRENCES

1. Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat Rev Cancer*. 2007 Oct;7(10):778–90.
2. Couraud S, Zalcman G, Milleron B, Morin F, Souquet P-J. Lung cancer in never smokers--a review. *Eur J Cancer*. 2012 Jun;48(9):1299–311.
3. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893–917.
4. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EUROCARE-5-a population-based study. *Lancet Oncol*. 2014 Jan;15(1):23–34.
5. Locher C, Debieuvre D, Coëtmeur D, Goupil F, Molinier O, Collon T, et al. Major changes in lung cancer over the last ten years in France: The KBP-CPHG studies. *Lung Cancer*. 2013 Mar 28;
6. Grivaux M, Zureik M, Marsal L, Asselain B, Peureux M, Chavaillon J-M, et al. Five-year survival for lung cancer patients managed in general hospitals. *Rev Mal Respir*. 2011 Sep;28(7):e31–38.
7. Detterbeck FC, Postmus PE, Tanoue LT. The stage classification of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2013 May;143(5 Suppl):e191S–210S.
8. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, 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 Aug;2(8):706–14.
9. Groome PA, Bolejack V, Crowley JJ, Kennedy C, Krasnik M, Sobin LH, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol*. 2007 Aug;2(8):694–705.
10. Travis W, Brambilla E, Müller-Hemerlinck H. Pathology and genetics of Tumours of of the Lung, pleura, thymus and Heart. Lyon: IARC Press; 2004. 344 p.
11. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, 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 Feb;6(2):244–85.
12. Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*. 2011 Feb;12(2):175–80.
13. Nowak F, Soria J-C, Calvo F. Tumour molecular profiling for deciding therapy-the French initiative. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012 Aug;9(8):479–86.
14. Barlesi F, Blons H, Beau-Faller M, Rouquette I, Ouafik L, Mosser J, et al. Biomarkers (BM) France: Results of routine EGFR, HER2, KRAS, BRAF, PI3KCA mutations detection and EML4-ALK gene fusion assessment on the first 10,000 non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (pts). *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(15_suppl).

15. Dearden S, Stevens J, Wu Y-L, Blowers D. Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap). *Ann Oncol.* 2013 Sep;24(9):2371–6.
16. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005 Apr;55(2):74–108.
17. Blair A, Freeman LB. Lung cancer among nonsmokers. *Epidemiology.* 2006 Nov;17(6):601–3.
18. Foeglé J, Hédélec G, Lebitasy M-P, Purohit A, Velten M, Quoix E. Specific features of non-small cell lung cancer in women: a retrospective study of 1738 cases diagnosed in Bas-Rhin between 1982 and 1997. *J Thorac Oncol.* 2007 Jun;2(6):466–74.
19. Blanchon F, Grivaux M, Collon T, Zureik M, Barbieux H, Bénichou-Flurin M, et al. [Epidemiologic of primary bronchial carcinoma management in the general French hospital centers]. *Rev Mal Respir.* 2002 Dec;19(6):727–34.
20. Boffetta P, Järnholm B, Brennan P, Nyrén O. Incidence of lung cancer in a large cohort of non-smoking men from Sweden. *Int J Cancer.* 2001 Nov;94(4):591–3.
21. Thun MJ, Hannan LM, Adams-Campbell LL, Boffetta P, Buring JE, Feskanich D, et al. Lung cancer occurrence in never-smokers: an analysis of 13 cohorts and 22 cancer registry studies. *PLoS Med.* 2008 Sep 30;5(9):e185.
22. Wakelee HA, Chang ET, Gomez SL, Keegan TH, Feskanich D, Clarke CA, et al. Lung cancer incidence in never smokers. *J Clin Oncol.* 2007 Feb 10;25(5):472–8.
23. Toh C-K, Gao F, Lim W-T, Leong S-S, Fong K-W, Yap S-P, et al. Never-smokers with lung cancer: epidemiologic evidence of a distinct disease entity. *J Clin Oncol.* 2006 May 20;24(15):2245–51.
24. Quoix E, Monnet I, Scheid P, Hamadouche A, Chouaid C, Massard G, et al. [Management and outcome of French elderly patients with lung cancer: an IFCT survey]. *Rev Mal Respir.* 2010 May;27(5):421–30.
25. Lee SE, Lee B, Hong M, Song J-Y, Jung K, Lira ME, et al. Comprehensive analysis of RET and ROS1 rearrangement in lung adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 2014 Sep 19;
26. Kim HR, Lim SM, Kim HJ, Hwang SK, Park JK, Shin E, et al. The frequency and impact of ROS1 rearrangement on clinical outcomes in never smokers with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol.* 2013 Sep;24(9):2364–70.
27. Mounawar M, Mukeria A, Le Calvez F, Hung RJ, Renard H, Cortot A, et al. Patterns of EGFR, HER2, TP53, and KRAS mutations of p14arf expression in non-small cell lung cancers in relation to smoking history. *Cancer Res.* 2007 Jun 15;67(12):5667–72.
28. Rudin CM, Avila-Tang E, Harris CC, Herman JG, Hirsch FR, Pao W, et al. Lung cancer in never smokers: molecular profiles and therapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 2009 Sep 15;15(18):5646–61.
29. Paik PK, Arcila ME, Fara M, Sima CS, Miller VA, Kris MG, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol.* 2011 May 20;29(15):2046–51.
30. Cardarella S, Ortiz TM, Joshi VA, Butaney M, Jackman DM, Kwiatkowski DJ, et al. The introduction of systematic genomic testing for patients with non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2012 Dec;7(12):1767–74.

31. Marchetti A, Felicioni L, Malatesta S, Grazia Sciarrotta M, Guetti L, Chella A, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol*. 2011 Sep 10;29(26):3574–9.
32. Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ*. 1997 Oct 18;315(7114):980–8.
33. Oberg M, Jaakkola MS, Woodward A, Peruga A, Prüss-Ustün A. Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. *Lancet*. 2011 Jan 8;377(9760):139–46.
34. Aldington S, Harwood M, Cox B, Weatherall M, Beckert L, Hansell A, et al. Cannabis use and risk of lung cancer: a case-control study. *Eur Respir J*. 2008 Feb;31(2):280–6.
35. Berthiller J, Straif K, Boniol M, Voirin N, Benhaïm-Luzon V, Ayoub WB, et al. Cannabis smoking and risk of lung cancer in men: a pooled analysis of three studies in Maghreb. *J Thorac Oncol*. 2008 Dec;3(12):1398–403.
36. Pairon J-C, Andujar P, Matrat M, Ameille J. [Etiology, epidemiology, biology. Occupational respiratory cancers]. *Rev Mal Respir*. 2008 Oct;25(8 Pt 2):3S18–31.
37. Couraud S, Fournel P, Moro-Sibilot D, Pérol M, Souquet P-J. Professional practice and accessibility to equipment in thoracic oncology. Results of a survey in Rhône-Alpes region (France). *Bull Cancer*. 2011 Jun 9;
38. Trédaniel J, Aarab-Terrisse S, Teixeira L, Savinelli F, Fraboulet S, Gossot D, et al. [Atmospheric air pollution and lung cancer: epidemiologic data]. *Rev Mal Respir*. 2009 Apr;26(4):437–445; quiz 481, 484.
39. Turner MC, Krewski D, Pope CA 3rd, Chen Y, Gapstur SM, Thun MJ. Long-term ambient fine particulate matter air pollution and lung cancer in a large cohort of never-smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Dec 15;184(12):1374–81.
40. Pope CA 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*. 2002 Mar 6;287(9):1132–41.
41. Pope CA 3rd, Ezzati M, Dockery DW. Fine-particulate air pollution and life expectancy in the United States. *N Engl J Med*. 2009 Jan 22;360(4):376–86.
42. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *The Lancet Oncology*. 2013 Aug;14(9):813–22.
43. Darby S, Hill D, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochicchio F, et al. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ*. 2005 Jan 29;330(7485):223.
44. Barros-Dios JM, Ruano-Ravina A, Pérez-Ríos M, Castro-Bernárdez M, Abal-Arca J, Tojo-Castro M. Residential radon exposure, histologic types, and lung cancer risk. A case-control study in Galicia, Spain. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012 Jun;21(6):951–8.
45. Lissowska J, Bardin-Mikolajczak A, Fletcher T, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, et al. Lung cancer and indoor pollution from heating and cooking with solid fuels: the IARC

international multicentre case-control study in Eastern/Central Europe and the United Kingdom. *Am J Epidemiol*. 2005 Aug 15;162(4):326–33.

46. Yu ITS, Chiu Y-L, Au JSK, Wong T-W, Tang J-L. Dose-response relationship between cooking fumes exposures and lung cancer among Chinese nonsmoking women. *Cancer Res*. 2006 May 1;66(9):4961–7.
47. Lissowska J, Foretova L, Dabek J, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, et al. Family history and lung cancer risk: international multicentre case-control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses. *Cancer Causes Control*. 2010 Jul;21(7):1091–104.
48. Brenner DR, McLaughlin JR, Hung RJ. Previous lung diseases and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. 2011;6(3):e17479.
49. Sidorchuk A, Agardh EE, Aremu O, Hallqvist J, Allebeck P, Moradi T. Socioeconomic differences in lung cancer incidence: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes Control*. 2009 May;20(4):459–71.
50. Büchner FL, Bueno-de-Mesquita HB, Linseisen J, Boshuizen HC, Kiemeny LALM, Ros MM, et al. Fruits and vegetables consumption and the risk of histological subtypes of lung cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Cancer Causes Control*. 2010 Mar;21(3):357–71.
51. Miller AB, Altenburg H-P, Bueno-de-Mesquita B, Boshuizen HC, Agudo A, Berrino F, et al. Fruits and vegetables and lung cancer: Findings from the European prospective investigation into cancer and nutrition. *International Journal of Cancer*. 2004 Jan 10;108(2):269–76.
52. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Scotti L, Jenab M, Bellocco R, et al. Alcohol consumption and lung cancer risk in never smokers: a meta-analysis. *Ann Oncol*. 2011 Dec;22(12):2631–9.
53. Subramanian J, Govindan R. Lung cancer in never smokers: a review. *J Clin Oncol*. 2007 Feb 10;25(5):561–70.
54. Bourgkard E, Wild P, Gonzalez M, Févotte J, Penven E, Paris C. Comparison of exposure assessment methods in a lung cancer case-control study: performance of a lifelong task-based questionnaire for asbestos and PAHs. *Occupational and Environmental Medicine [Internet]*. 2013 Sep 18; Available from: <http://oem.bmj.com/content/early/2013/09/18/oemed-2013-101467.abstract>
55. Varghese AM, Sima CS, Chaft JE, Johnson ML, Riely GJ, Ladanyi M, et al. Lungs don't forget: Comparison of the KRAS and EGFR mutation profile and survival of collegiate smokers and never smokers with advanced lung cancers. *J Thorac Oncol*. 2013 Jan;8(1):123–5.
56. Coëtmeur D, Briens E, Perrin C, Ciobanu D, Leleu O, Mouries J-C, et al. Lung cancer characteristics in 762 never- and 6,246 ever-smoker patients: Study KBP-2010-CPHG. *J Clin Oncol*. 2014 May;32(15_suppl):1582.
57. Shaw AT, Ou S-HI, Bang Y-J, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in ROS1-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2014 Sep 27;
58. Clément-Duchêne C, Vignaud J-M, Stoufflet A, Bertrand O, Gislard A, Thiberville L, et al. Characteristics of never smoker lung cancer including environmental and occupational risk factors. *Lung Cancer*. 2010 Feb;67(2):144–50.

59. Vineis P, Airoidi L, Veglia F, Olgiati L, Pastorelli R, Autrup H, et al. Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study. *BMJ*. 2005 Feb 5;330(7486):277.
60. Kim HR, Shim HS, Chung J-H, Lee YJ, Hong YK, Rha SY, et al. Distinct clinical features and outcomes in never-smokers with nonsmall cell lung cancer who harbor EGFR or KRAS mutations or ALK rearrangement. *Cancer*. 2012 Feb 1;118(3):729–39.
61. Paik PK, Johnson ML, D’Angelo SP, Sima CS, Ang D, Dogan S, et al. Driver mutations determine survival in smokers and never-smokers with stage IIIB/IV lung adenocarcinomas. *Cancer*. 2012 Dec 1;118(23):5840–7.
62. Lee YJ, Cho BC, Jee SH, Moon JW, Kim SK, Chang J, et al. Impact of environmental tobacco smoke on the incidence of mutations in epidermal growth factor receptor gene in never-smoker patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 20;28(3):487–92.
63. Tam IYS, Chung LP, Suen WS, Wang E, Wong MCM, Ho KK, et al. Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. *Clin Cancer Res*. 2006 Mar 1;12(5):1647–53.
64. Kawaguchi T, Ando M, Kubo A, Takada M, Atagi S, Okishio K, et al. Long exposure of environmental tobacco smoke associated with activating EGFR mutations in never-smokers with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2011 Jan 1;17(1):39–45.
65. Kubo A, Masahiko A, Ross S, Tornoya K, Sai-Hong I O, Myung-Ju A. Impacts of environmental tobacco smoke on EGFR mutations and ALK rearrangements in never smokers with non-small cell lung cancer: analyses on a prospective multinational ets registry. *J Thorac Oncol*. 2013 Nov;8(Supp 2):S1–S1410.
66. Taga M, Mechanic LE, Hagiwara N, Vähäkangas KH, Bennett WP, Alavanja MCR, et al. EGFR somatic mutations in lung tumors: radon exposure and passive smoking in former- and never-smoking U.S. women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012 Jun;21(6):988–92.
67. Besaratinia A, Pfeifer GP. Second-hand smoke and human lung cancer. *Lancet Oncol*. 2008 Jul;9(7):657–66.
68. Bennett WP, Alavanja MC, Blomeke B, Vähäkangas KH, Castrén K, Welsh JA, et al. Environmental tobacco smoke, genetic susceptibility, and risk of lung cancer in never-smoking women. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Dec 1;91(23):2009–14.
69. Ryan BM, Wang Y, Jen J, Yi ES, Olivo-Marston S, Yang P, et al. Evidence that the lung Adenocarcinoma EML4-ALK fusion gene is not caused by exposure to secondhand tobacco smoke during childhood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014 Jul;23(7):1432–4.
70. Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker--a critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta*. 2010 Nov 11;411(21-22):1611–24.
71. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013 Aug;10(8):472–84.
72. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2011 Jun;11(6):426–37.
73. Aung KL, Board RE, Ellison G, Donald E, Ward T, Clack G, et al. Current status and future potential of somatic mutation testing from circulating free DNA in patients with solid tumours. *Hugo J*. 2010 Dec;4(1-4):11–21.

74. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta*. 2013 Sep 23;424:222–30.
75. Vallée A, Marcq M, Bizieux A, Kouri CE, Lacroix H, Bennouna J, et al. Plasma is a better source of tumor-derived circulating cell-free DNA than serum for the detection of EGFR alterations in lung tumor patients. *Lung Cancer*. 2013 Nov;82(2):373–4.
76. Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutat Res*. 2007 Jun;635(2-3):105–17.
77. Jen J, Wu L, Sidransky D. An overview on the isolation and analysis of circulating tumor DNA in plasma and serum. *Ann N Y Acad Sci*. 2000 Apr;906:8–12.
78. Esposito A, Bardelli A, Criscitiello C, Colombo N, Gelao L, Fumagalli L, et al. Monitoring tumor-derived cell-free DNA in patients with solid tumors: clinical perspectives and research opportunities. *Cancer Treat Rev*. 2014 Jun;40(5):648–55.
79. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Jan;1775(1):181–232.
80. Kohler C, Radpour R, Barekati Z, Asadollahi R, Bitzer J, Wight E, et al. Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Mol Cancer*. 2009;8:105.
81. Zhong XY, Ladewig A, Schmid S, Wight E, Hahn S, Holzgreve W. Elevated level of cell-free plasma DNA is associated with breast cancer. *Arch Gynecol Obstet*. 2007 Oct;276(4):327–31.
82. Frattini M, Gallino G, Signoroni S, Balestra D, Battaglia L, Sozzi G, et al. Quantitative analysis of plasma DNA in colorectal cancer patients: a novel prognostic tool. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Sep;1075:185–90.
83. Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, et al. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2013 Mar 13;
84. Kamat AA, Baldwin M, Urbauer D, Dang D, Han LY, Godwin A, et al. Plasma cell-free DNA in ovarian cancer: an independent prognostic biomarker. *Cancer*. 2010 Apr 15;116(8):1918–25.
85. Wang J-Y, Hsieh J-S, Chang M-Y, Huang T-J, Chen F-M, Cheng T-L, et al. Molecular detection of APC, K- ras, and p53 mutations in the serum of colorectal cancer patients as circulating biomarkers. *World J Surg*. 2004 Jul;28(7):721–6.
86. Pinzani P, Salvianti F, Cascella R, Massi D, De Giorgi V, Pazzagli M, et al. Allele specific Taqman-based real-time PCR assay to quantify circulating BRAFV600E mutated DNA in plasma of melanoma patients. *Clin Chim Acta*. 2010 Sep 6;411(17-18):1319–24.
87. Ulivi P, Silvestrini R. Role of quantitative and qualitative characteristics of free circulating DNA in the management of patients with non-small cell lung cancer. *Cell Oncol (Dordr)*. 2013 Dec;36(6):439–48.
88. Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, Jermann M, Marx A, Chassé E, et al. Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2004 Oct 15;22(20):4157–64.
89. Couraud S, Vaca-Paniagua F, Villar S, Oliver J, Schuster T, Blanché H, et al. Noninvasive Diagnosis of Actionable Mutations by Deep Sequencing of Circulating Free DNA in Lung Cancer from Never-

Smokers: A Proof-of-Concept Study from BioCAST/IFCT-1002. *Clin Cancer Res.* 2014 Sep 1;20(17):4613–24.

90. Sozzi G, Conte D, Mariani L, Lo Vullo S, Roz L, Lombardo C, et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res.* 2001 Jun 15;61(12):4675–8.
91. Lee YJ, Yoon K-A, Han J-Y, Kim HT, Yun T, Lee GK, et al. Circulating cell-free DNA in plasma of never smokers with advanced lung adenocarcinoma receiving gefitinib or standard chemotherapy as first-line therapy. *Clin Cancer Res.* 2011 Aug 1;17(15):5179–87.
92. Kumar S, Guleria R, Singh V, Bharti AC, Mohan A, Das BC. Efficacy of circulating plasma DNA as a diagnostic tool for advanced non-small cell lung cancer and its predictive utility for survival and response to chemotherapy. *Lung Cancer.* 2010 Nov;70(2):211–7.
93. Marcq M, Vallée A, Bizieux A, Denis MG. Detection of EGFR mutations in the plasma of patients with lung adenocarcinoma for real-time monitoring of therapeutic response to tyrosine kinase inhibitors? *J Thorac Oncol.* 2014 Jul;9(7):e49–50.
94. Sorensen BS, Wu L, Wei W, Tsai J, Weber B, Nexø E, et al. Monitoring of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-sensitizing and resistance mutations in the plasma DNA of patients with advanced non-small cell lung cancer during treatment with erlotinib. *Cancer.* 2014 Aug 7;
95. Fournié GJ, Courtin JP, Laval F, Chale JJ, Pourrat JP, Pujazon MC, et al. Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours. *Cancer Lett.* 1995 May 8;91(2):221–7.
96. Sozzi G, Roz L, Conte D, Mariani L, Andriani F, Lo Vullo S, et al. Plasma DNA quantification in lung cancer computed tomography screening: five-year results of a prospective study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 Jan 1;179(1):69–74.
97. Van der Drift MA, Hol BEA, Klaassen CHW, Prinsen CFM, van Aarssen YAWG, Donders R, et al. Circulating DNA is a non-invasive prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2010 May;68(2):283–7.
98. Goto K, Ichinose Y, Ohe Y, Yamamoto N, Negoro S, Nishio K, et al. Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum: from IPASS, a phase III study of gefitinib or carboplatin/paclitaxel in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2012 Jan;7(1):115–21.
99. Sisti J, Boffetta P. What proportion of lung cancer in never-smokers can be attributed to known risk factors? *Int J Cancer.* 2012 Jul 15;131(2):265–75.
100. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012 Mar 8;366(10):883–92.

XV. TABLES DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 - Evolution des taux standardisés d'incidence (trait plein) et de mortalité (traits pointillés) du cancer broncho-pulmonaire en France chez l'homme et chez la femme.	20
Figure 2 - Taux standardisé sur l'âge de survie à 5ans du cancer broncho-pulmonaire selon les pays d'Europe. La moyenne européenne figure en clair ; la valeur en France en foncé	21
Figure 3 - Évolution des formes histologiques de cancers broncho-pulmonaires en France entre 2000 et 2010 (d'après (5))	23
Figure 4 - Profil moléculaire en fonction du type histologique et de l'origine géographique des patients (d'après la référence (15))	24
Figure 5 - Proportion des cas de cancers chez les non-fumeurs selon différentes régions du monde (d'après référence (1)).....	25
Figure 6 - Incidence et mortalité des différentes localisations de cancer en Europe dans les deux sexes (haut) et chez les femmes (bas), et considérant le cancer bronchique du non-fumeur comme une entité à part (flèche).....	26
Figure 7 - Diagnostic de cancer broncho-pulmonaire en 2000 (bas) et 2010 (haut) en fonction du statut tabagique. D'après référence (5).	27
Figure 8 - Biomarqueur en fonction du statut tabagique dans l'étude Biomarqueur France (n=9911; d'après référence (14))	29
Figure 9 - Concentration annuelle moyenne en PM10 dans différentes villes de France en 2008. La ligne pointillée indique le seuil recommandé par l'OMS.....	32
Figure 10 - Evolution du risque de survenue d'un CBNF en fonction de l'exposition aux vapeurs d'huile de cuisson dans une cohorte de femmes non-fumeuses asiatiques (adapté de la référence (46)).	33
Figure 11 - Carte des centres participants et actifs indiquant le niveau d'inclusion.....	78
Figure 12 - Détails des inclusions dans chacun des centres participants au cours de la période de l'étude	79
Figure 13 - Evolution de l'ouverture des centres de l'étude IFCT 1002	80
Figure 14 - Flow chart général de l'étude BioCAST	83
Figure 15 - Profil histologique comparé des non-fumeurs de BioCAST et des fumeurs de KBP 2010 85	
Figure 16 - Profil comparé du stade au diagnostic chez les non-fumeurs de BioCAST et les fumeurs de KBP 2010	85
Figure 17 - Exposition au tabagisme passif selon le genre, de manière globale (A), au travail (B) et de manière domestique (C). *p < 10-4; **p<0,01	86
Figure 18 - Durée d'exposition cumulée au tabagisme passif selon le genre et divisée en trois catégories. **p<0,01	87

Figure 19 - Exposition certaines aux différents carcinogènes professionnels en fonction du genre. HAP – Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques. *p < 10-4; **p<0,001; ***p<0,05	88
Figure 20 - Exposition aux polluants domestiques (huile de cuisson à droite, fumées de chauffage et cuisine à gauche) selon le genre.....	89
Figure 21 - Fréquence d'exposition aux antécédents familiaux de cancers broncho-pulmonaire (Haut-droite), aux antécédent personnel de cancer de tous site (Haut-gauche), aux antécédents personnels de bronchopathie chronique (asthme, BPCO, emphyseme; Bas-droite) et aux antécédents personnels d'infections pulmonaires (tuberculose, pneumonie, coqueluche ; bas-gauche)	90
Figure 22 - Fréquence et type de mutation observée en fonction du genre (n=339).....	91
Figure 23 - Répartition des mutations somatiques chez les non-fumeurs de BioCAST (n=285, en haut) et les fumeurs de biomarqueurs France (n=7789, en bas).....	92
Figure 24 - Comparaison du profil somatique chez des non-fumeurs Français, américains et asiatiques (d'après référence (2)).....	93
Figure 25 - Diagramme d'inclusion des patients inclus dans l'analyse du profil moléculaire selon l'exposition au tabagisme passif.....	122
Figure 26 - Fréquence de mutation EGFR, KRAS et de réarrangement ALK en fonction de l'exposition au tabagisme passif.....	124
Figure 27 - Diagramme d'inclusion pour l'analyse du profil somatique en fonction de l'exposition professionnelle	140
Figure 28 - Différentes expositions professionnelles de chacun des patients de la série.....	141
Figure 29 - Fréquence de mutation des biomarqueurs en fonction de l'exposition à l'amiante (haut) et à la silice (bas). *p=0,033, les autres sont NS.	142
Figure 30 - Fréquence de mutation des biomarqueurs en fonction de l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (haut), au diesel (milieu) et au chrome (bas)	143
Figure 31 - Diagramme des patients inclus dans l'analyse des facteurs hormonaux et reproductifs .	144
Figure 32 - Profil moléculaire en fonction de l'âge aux premières règles chez les femmes.	146
Figure 33 - Profil moléculaire en fonction de la durée de la vie sexuelle (âge de la ménopause - âge aux premières règles) chez les femmes.....	147
Figure 34 - Répartition de la taille des fragments d'ADN caractérisé dans le plasma d'un individu. Les fragments 35 et 10380 sont les références. Quinze fragments ont été mis en évidence dans ce prélèvement: taille moyenne 5574pb; min 167pb; max 14182pb.	152
Figure 35 - Évolution des fractions mutées EGFR au cours d'un traitement par ITK et corrélation avec la progression RECIST chez des patients (extrait de la référence (93)).....	156

XVI. ANNEXES

- A. Article paru dans Nature à propos du cancer broncho-pulmonaire des non-fumeurs.**
- B. Questionnaire patient utilisé dans l'étude BioCAST.**
- C. Questionnaire médecin utilisé dans l'étude BioCAST.**

A. Article paru dans Nature à propos du cancer broncho-pulmonaire des non-fumeurs.

Cet article fait état d'un entretien avec Sébastien Couraud à propos du travail mené avec la cohorte BioCAST.

Deweerd S. Aetiology: Crucial clues. *Nature*. 2014 Sep 11;513(7517):S12-3.



In southeast Asia, half of all the women who develop lung cancer have never smoked. In fact, if lung cancer in never-smokers were considered a distinct disease, it would be the seventh leading cancer killer worldwide¹ (see 'Killing without smoke').

RUSSELL COBB

It makes sense to consider lung cancer in never-smokers separately. "It is almost like a different disease," says Joan Schiller, a lung-cancer specialist at the University of Texas Southwestern Medical Center in Dallas. Lung cancer in people who have never smoked is almost always a subtype of non-small-cell lung cancer called adenocarcinoma. By contrast, smokers get not only adenocarcinoma but also squamous cell carcinoma and small-cell lung cancer. Tumours in never-smokers tend to be less aggressive than in smokers, although they are frequently diagnosed at a more advanced stage because never-smokers, and their doctors, regard lung cancer as an exceedingly unlikely prospect and so often miss the early signs.

Tumours in never-smokers also tend to carry a distinctive set of genetic changes called driver mutations that are involved in turning cells malignant. Classifying patients according to their history of smoking has helped to understand lung cancer's gene mutations over the past decade, but researchers have found that this is not the best strategy for treating individual patients. That is because the most effective treatment often depends on the molecular characteristics of the tumour, not the characteristics of the patient. "Smoking status is sort of a surrogate for that, but it's an imperfect surrogate," says thoracic oncologist Charles Rudin at Memorial Sloan Kettering Cancer Center in New York City. So the task now is not only to continue to work out the patterns and consequences of tumour mutations, but also to delve into some of the mysterious aspects of lung cancer in never-smokers — especially the genetic and environmental causes and how to mitigate them.

GENETIC VARIATIONS

Studying the mechanisms of lung cancer is easier in never-smokers because they have not been exposed to the onslaught of DNA-altering chemicals in cigarette smoke. This has helped researchers to sort out which changes in a lung-cancer cell are driver mutations and which are passenger mutations — those that are simply along for the ride. "The lung cancers that occur in never-smokers are genetically simpler," says Rudin. "They have fewer mutations, but they may have the key mutations that are really important drivers."

The first clues that studying lung cancer in never-smokers might be particularly helpful in understanding the mechanisms of the disease emerged in the early 2000s. Clinical trials analysing a class of cancer medication called small-molecule tyrosine kinase inhibitors, which targets a family of proteins that

AETIOLOGY

Crucial clues

Studies in never-smokers have revealed key lung-cancer mutations — but the cause of the disease is still a mystery.

BY SARAH DEWEERDT

The lung-cancer patients that thoracic oncologist Sébastien Couraud remembers most are those who have never smoked cigarettes. He recalls one woman who tried for years to get her husband to stop his heavy habit, but in the end it was her, not him, who developed lung cancer — perhaps from breathing second-hand smoke. Another patient, the wife of a smoker, developed lung cancer long after her husband died of the

disease. Couraud also remembers a group of colleagues who had been exposed to the same workplace carcinogen and who attended chemotherapy treatments together — until one day one of them didn't. "It's these patients you keep in your mind," says Couraud, who works at Hospices Civils de Lyon in France.

About one quarter of lung-cancer cases worldwide occur in people who have smoked fewer than 100 cigarettes in their life. In Europe and the United States, people who have never smoked account for 10–15% of lung cancers.

are mutated in many types of cancer, showed that never-smokers, individuals with adenocarcinoma, women and people with east Asian ancestry were more likely to respond well to the drugs than people with a history of smoking².

In 2004, three independent groups published studies that uncovered the molecular basis behind these observations. This class of tyrosine kinase inhibitors is effective against lung cancers that carry mutations in the epidermal growth factor receptor (*EGFR*) gene³⁻⁵. These mutations are more common in lung cancers that occur in the groups that responded well to the drugs in clinical trials. *EGFR* mutations are seen in 28% of never-smokers with lung cancer in the United States and in 68% of Asian people. By contrast, such mutations occur in only 5% of current smokers and in 11% of former smokers with lung cancer in the United States.

Since then, researchers have identified additional lung-cancer driver mutations that are more common in never-smokers than smokers¹. “Many of the discovery efforts have been focused on never-smokers as a way of finding these driver mutations,” says Geoffrey Oxnard, a thoracic oncologist at Dana-Farber Cancer Institute in Boston, Massachusetts. Researchers have identified therapies that target some of these tumour mutations, and the search is on for others.

FATAL RESISTANCE

The relationship between the types of lung-cancer mutations and whether someone smokes are not absolute. For example, although *EGFR* mutations are more common in never-smokers, one-third of lung cancers with *EGFR* mutations occur in smokers — therefore, knowledge of driver mutations and corresponding treatments gleaned from studies of never-smokers may benefit smokers with the disease. Testing for mutations in genes such as *EGFR* is gaining popularity as a tool for lung-cancer management in smokers and never-smokers.

Half to three-quarters of lung-cancer patients who have never smoked carry at least one mutation that will respond to targeted therapies such as tyrosine kinase inhibitors. This might seem encouraging news for never-smokers with lung cancer — but only to a point. “Their cancer is more treatable than cancer in smokers and they live longer as a result of having these targetable mutations, but we’re not curing them,” says Barbara Gitlitz, a lung-cancer specialist at the University of Southern California in Los Angeles. “It’s still an extremely deadly disease.” In part, this is because of the lower lung scrutiny that never-smokers get. “We’re diagnosing these people at stages where they’re not curable,” Gitlitz explains.

But there is more negative news: the targeted therapies that benefit many never-smokers

with lung cancer eventually stop working because the tumours develop drug resistance. Tackling drug resistance, suggests Rudin, will require better versions of targeted therapies — or better ways to use them (see page S8).

TROUBLESOME RISKS

Perhaps an even bigger mystery is what causes lung cancer in never-smokers, and how risk factors produce different driver mutations in lung tumours. “Lung cancer in never-smokers is a very interesting tool to focus on risk factors for lung cancer other than smoking,” explains Couraud, who is working on a comprehensive study of tumour mutations among 384 never-smokers in France who have lung cancer.

Some risk factors are well known — breathing in second-hand cigarette smoke, for example, which is responsible for 20–50% of lung-cancer deaths in never-smokers in the

to stop smoking,” Oxnard says.

Before cigarette smoking became widespread, lung cancer was rare, leading to just 0.7% of cancer deaths in the United States in 1914, versus an estimated 27% in 2014. Respiratory cancers — a category that includes not only lung cancer but also mesothelioma

— are the most common cancers acquired as a result of exposures on the job to carcinogens such as asbestos or silica, for example.

“Lung cancer is not going to entirely go away because we convince people to stop smoking.”

Connecting what is known about lung-cancer risk factors to individual patients

remains difficult. “We don’t have a clear understanding of why the majority of never-smokers develop lung cancer,” Rudin says.

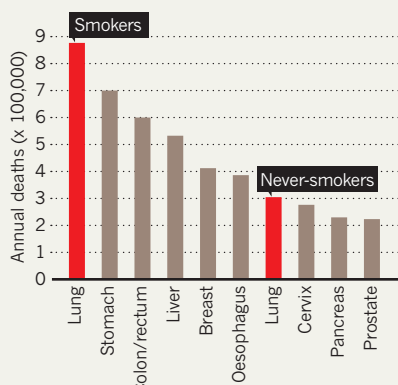
Some lung-cancer risk probably also comes from inherited genetic factors. Until five years ago, most studies investigating familial lung cancer have focused on families who smoked. As a result, there has been no good way to distinguish whether it is exposure to second-hand smoke or genes that have caused lung cancer. Researchers are just beginning to puzzle out the inherited factors that increase lung-cancer risk in the absence of exposure to tobacco smoke. A few studies have identified individuals with an inherited mutation in *EGFR*. This mutation, working through a mechanism that is not yet understood, seems to produce resistance to targeted therapies and also increase susceptibility to developing lung cancer^{6,7}.

The population of people who have never smoked but have lung cancer has become a model for studying other subgroups of people with the disease. Oxnard and Gitlitz, for example, are co-leading a study of genomic changes in patients who were diagnosed with lung cancer before the age of 40. Lung cancer is rare in this age group, and researchers say that studying this population may help to uncover additional driver mutations and therapeutic approaches — just as studies of never-smokers have done. “We as clinicians have the responsibility to keep our eyes open for such clinical outliers,” Oxnard says, “because they may provide unique insights on a more deep biological level.” ■

Sarah Deweerdt is a freelance science writer in Seattle, Washington.

KILLING WITHOUT SMOKE

If considered as a separate disease, lung cancer in people who have never smoked would rank seventh in global cancer mortality.



United States. Studies have shown¹ that the more second-hand smoke a person is exposed to, the less likely he or she is to have *EGFR*-mutant lung cancer — in other words, breathing in a lot of second-hand smoke is likely to cause the same form of lung cancer as that seen in smokers. Curiously, however, data from the French cohort of never-smokers does not show this pattern — in fact, Couraud reports, those data show no relationship between second-hand smoke exposure and any driver mutation.

And tobacco smoke is not the whole story. In east Asia, never-smokers who develop lung cancer are disproportionately women, in part because of exposure to coal smoke in unventilated homes (see page S16). And in 2013, the International Agency for Research on Cancer confirmed outdoor air pollution as carcinogenic (see page S14). As the number of people smoking cigarettes continues to decline throughout the world, risk factors for lung cancer will change. “Lung cancer is not going to entirely go away because we convince people

1. Couraud, S. *et al.* *Eur. J. Cancer* **48**, 1299–1311 (2012).
2. Sun, S., Schiller, J. H. & Gazdar, A. F. *Nature Rev. Cancer* **7**, 778–790 (2007).
3. Lynch, T. J. *et al.* *N. Engl. J. Med.* **350**, 2129–2139 (2004).
4. Paez, J. G. *et al.* *Science* **304**, 1497–1500 (2004).
5. Pao, W. *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 13306–13311 (2004).
6. Oxnard, G. R. *et al.* *J. Thorac. Oncol.* **7**, 1049–1052 (2012).
7. Gazdar, A. *et al.* *J. Thorac. Oncol.* **9**, 456–463 (2014).

B. Questionnaire patient utilisé dans l'étude BioCAST.

1-Données générales

1.1-Vous êtes

☐ Un homme

☐ Une femme

1.2-Mois et année de naissance :

|_|_|_|_|/|_|_|_|_|_|_|_|_|

1.3 Lieu de naissance :

Pays : _____

Ville : _____

Code Postal ① : |_|_|_|_|_|_|_|_|_|

① Pour l'étranger, indiquez 99999

1.4-Votre Taille ? ① _____cm

1.5-Votre Poids ? ① _____Kg

① Indiquez votre taille « administrative » (celle figurant sur votre carte d'identité). Pour le poids, si vous avez maigri récemment, merci d'indiquer votre « poids de forme ».

1.6-Lieu de naissance des grands-parents

Grand-père (paternel) : Ville _____ Pays _____

Grand-mère (paternelle) : Ville _____ Pays _____

Grand-père (maternel) : Ville _____ Pays _____

Grand-mère (maternelle) : Ville _____ Pays _____

1.7-Lieu de naissance des parents

Père : Ville _____ Pays _____

Mère : Ville _____ Pays _____

1.8-Votre situation familiale actuelle

☐ Marié(e) / Concubinage / PACS

☐ Divorcé(e) / Séparé(e)

☐ Veuf(ve)

☐ Célibataire

☐ Autre : précisez _____

1.9- Votre niveau d'étude (dernier diplôme obtenu)

☐ Niveau BAC + 8 ou plus

☐ Niveau BAC

☐ Je n'ai pas été scolarisé

☐ Niveau BAC + 5

☐ Niveau Troisième (BEPC)

☐ Autre _____

☐ Niveau BAC + 3

☐ Niveau Sixième

1.10- Votre situation professionnelle AVANT le diagnostic de cancer du poumon ?

☐ En activité

☐ Recherche d'emploi

☐ Retraité(e)

☐ En invalidité ou en arrêt de maladie de longue durée (pour une autre maladie que le cancer du poumon)

☐ Autre _____

2-Tabagisme et toxiques inhalés

2.1-Avez-vous fumé du tabac vous-même ? ☐ NON ☐ OUI

Si OUI : ☐ Vous avez fumé moins de 100 cigarettes dans toute votre vie

☐ Vous avez fumé plus de 100 cigarettes dans toute votre vie

Actuellement, avez-vous totalement arrêté de fumer ? ☐ NON ☐ OUI

Si vous avez fumé de manière régulière :

Préciser la date de début ? / / ☐ NSP

Préciser la date d'arrêt ? / / ☐ NSP

Mois

Année

Mois

Année

Indiquez votre consommation: cigarette(s)/paquet(s)* par jour ☐ NSP

* Entourez la mention adéquate

Concernant le début, était-il durant :

☐ Collège / Lycée

☐ Etudes post bac

☐ Vie Professionnelle

☐ Service militaire

☐ _____

Si vous avez fumé de manière discontinue :

Période	Date de début	Date d'arrêt	Consommation	Remarque sur le début
#1	/ / ☐ NSP	/ / ☐ NSP	cigarette(s)/paquet(s)* par jour ☐ NSP	Collège / Lycée Etudes post bac Vie Professionnelle Service militaire
#2	/ / ☐ NSP	/ / ☐ NSP	cigarette(s)/paquet(s)* par jour ☐ NSP	Collège / Lycée Etudes post bac Vie Professionnelle Service militaire
#3	/ / ☐ NSP	/ / ☐ NSP	cigarette(s)/paquet(s)* par jour ☐ NSP	Collège / Lycée Etudes post bac Vie Professionnelle Service militaire
#4	/ / ☐ NSP	/ / ☐ NSP	cigarette(s)/paquet(s)* par jour ☐ NSP	Collège / Lycée Etudes post bac Vie Professionnelle Service militaire

* Entourez la mention adéquate

2-2-Avez-vous consommé régulièrement :

Des cigares ou cigarillos ☐ NON ☐ OUI Combien ? _____ /jour pendant _____ années

Date d'arrêt / / ☐ NSP

La pipe ☐ NON ☐ OUI Combien ? _____ /jour pendant _____ années

Date d'arrêt / / ☐ NSP

La chicha ☐ NON ☐ OUI Combien ? _____ /jour pendant _____ années

Date d'arrêt / / ☐ NSP

Du tabac à chiquer ☐ NON ☐ OUI Combien ? _____ /jour pendant _____ années

Date d'arrêt / / ☐ NSP

2.3-Tabagisme passif (domestique)

Avez-vous été exposé au tabagisme de l'un de vos proches (parents, conjoints...) lorsque vous viviez avec lui (elle) et pendant plus de 1 an ? ☐ NON ☐ OUI

Si OUI :

	avec le mem (père, mère, conjoint...)	Nombre de cigarettes/j	Nombre d'années d'exposition ①	Exposition avant 18 ans ? Cochez la case
Membre du foyer #1				☐
Membre du foyer #2				☐
Membre du foyer #3				☐
Membre du foyer #4				☐
Membre du foyer #5				☐
Membre du foyer #6				☐

① C'est-à-dire le nombre d'années pendant lesquelles vous avez vécu avec lui (elle) ET qu'il (elle) fumait. Si il (elle) a arrêté puis repris le tabac, indiquez le nombre total d'années.

2.4-Tabagisme passif (professionnel)

Lors de votre vie professionnelle avez-vous travaillé dans la même pièce qu'un ou plusieurs fumeurs (qui fumaient, en votre présence et dans cette pièce, pendant plus de 1 an) ?

☐ NON ☐ OUI

Si OUI :

	Nombre de cigarette	Nombre d'années d'exposition
Fumeur 1		
Fumeur 2		
Fumeur 3		
Fumeur 4		

2.5-Cannabis : Avez-vous vous-même fumé régulièrement du cannabis ?

☐ NON ☐ OUI

Si OUI : Combien de joints avez-vous fumé ? _____ joints /jour* /semaine* /mois*

☐ Occasionnel (moins de 1 joint / mois) * Entourez la mention correspondante.

Durant combien de temps ? _____ans

① En cas d'arrêt et de reprise, indiquez le nombre total d'année.

Date d'arrêt |_|_|/|_|_|_|_| ☐ NSP

3-Situation professionnelle

3.1-Quelles étaient vos professions successives (activité principale de plus de 1 an) ? Pour chacune, merci d'indiquer votre poste ainsi que les années de début et de fin de cette activité

	Profession①	Activité①	Année début	Année fin	Poste	Employeur
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

① La colonne « profession » correspond au type de métier (par exemple « cadre » ou « agriculteur ») et la colonne « activité » permet de préciser le type de travail effectué (par exemple : « activité juridique » ou « élevage de vache laitière »). La colonne « poste » permet de décrire le poste de travail si vous le souhaitez. Pour les périodes sans emploi (plus de 1 an), merci d'indiquer « Sans » dans la colonne profession, suivie des années de début et de fin ; puis de remplir le motif (chômage, invalidité...) dans la colonne poste. Si vous êtes votre propre employeur, merci d'indiquer « libéral » dans la colonne employeur.

3.2-Quelles étaient les professions principales (plus de 1 an) des membres de votre foyer (parents, conjoints) lorsque vous viviez sous le même toit pendant plus d'un an ?

Membre	Lien de parenté	Profession①	Activité①
1			
2			
3			
4			
5			

Vous pouvez inscrire jusqu'à deux professions par membre.

3.3-Etes-vous reconnu(e) en maladie professionnelle par la sécurité sociale ?

☐ NON ☐ OUI

Si OUI : Pour quelle maladie ?

☐ Cancer du poumon ☐ Bronchite chronique / insuffisance respiratoire

☐ Plaques pleurales ☐ Ne sait pas ☐ Autre, précisez : _____

3.4-Merci de répondre aux questions suivantes concernant vos professions

Notations :

1 = rare (<1%)

2 = occasionnel (1-9%)

3 = discontinu (10-29%)

4 = régulier (30-69%)

5 = quotidien (>70%)

1. Avez-vous manipulé de l'amiante ou des matériaux en contenant, quelle qu'en soit la forme : vrac, tissu, toiles, matelas,... ?

☐ OUI ☐ NON ☐ NSP ☐ Pas sûr de la présence d'amiante

N° De à Fréquence | N° De à Fréquence
_ _ _ _ _ | _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP | _ _ _ _ _ | _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP

*Reportez le numéro de l'emploi concerné en vous référant au tableau de la question 3.1 ci-dessus. - **Année de début - ***Année de fin

2. Avez-vous coupé, percé, meulé ou usiné des joints ou des garnitures d'étanchéité (par exemple sur des tuyaux, des fours ou des moteurs, des joints klingérites) ou bien avez-vous poncé des supports de joints usagés ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP ☐ Pas sûr de la présence d'amiante

N° De à Fréquence | N° De à Fréquence
_ _ _ _ _ | _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP | _ _ _ _ _ | _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP

3. Avez-vous utilisé des protections en amiante pour vous protéger contre la chaleur : vêtements, gants, tabliers,... ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP ☐ Pas sûr de la présence d'amiante

N° De à Fréquence | N° De à Fréquence
_ _ _ _ _ | _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP | _ _ _ _ _ | _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP

4. Avez-vous utilisé des protections en amiante dans des procédés industriels comme la soudure : toiles, plaques, coussins ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP ☐ Pas sûr de la présence d'amiante

N° De à Fréquence | N° De à Fréquence
_ _ _ _ _ | _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP | _ _ _ _ _ | _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP

5. Avez-vous travaillé à proximité immédiate de personnes utilisant des matériaux tels que toiles, coussins, matelas à base d'amiante ? (ex : soudeurs)

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP ☐ Pas sûr de la présence d'amiante

N° De à Fréquence | N° De à Fréquence
_ _ _ _ _ | _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP | _ _ _ _ _ | _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP

6. Avez-vous installé, remplacé ou coupé des matériaux d'isolation (contre la chaleur, le bruit, le feu) du type amiante ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP ☐ Pas sûr de la présence d'amiante

N° De à Fréquence | N° De à Fréquence
_ _ _ _ _ | _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP | _ _ _ _ _ | _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP

7. Avez-vous effectué des travaux de calorifugeage avec des matériaux à base d'amiante ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP ☐ Pas sûr de la présence d'amiante

N° De à Fréquence | N° De à Fréquence
_ _ _ _ _ | _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP | _ _ _ _ _ | _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP

8. Avez-vous effectué projeté ou retiré du flocage contenant de l'amiante ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP ☐ Pas sûr de la présence d'amiante

N° De à Fréquence | N° De à Fréquence
_ _ _ _ _ | _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP | _ _ _ _ _ | _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP

9. Avez-vous travaillé à proximité immédiate de personnes réalisant des opérations de calorifugeage, flocage à base d'amiante ?

☐ OUI ☐ NON ☐ NSP ☐ Pas sûr de la présence d'amiante

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

10. Avez-vous fait des travaux d'entretien ou de réparation sur des matériaux chauds tels que chaudières, fours, étuves, moteurs, turbines, ... ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP ☐ Pas sûr de la présence d'amiante

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

11. Avez-vous eu à effectuer des interventions sur des matériaux isolés, ignifugés, calorifugés, ou ayant été préalablement décalorifugés tels que des plafonds, gaines de tuyauteries, ... ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP ☐ Pas sûr de la présence d'amiante

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

12. Avez-vous fabriqué ou réparé des mécanismes de freinage ou d'embrayage (voitures, poids lourds, chariots moteurs, treuils, bobines, ...) ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP ☐ Pas sûr de la présence d'amiante

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

13. Avez-vous fait du perçage, sciage ou découpage de matériaux à base de fibrociment du type canalisation, adduction d'eau, gaine techniques, recouvrement de toiture, plaque amiante-ciment ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP ☐ Pas sûr de la présence d'amiante

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

14. Etes-vous déjà intervenu sur des plafonds, des murs ou des cloisons floquées ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP ☐ Pas sûr de la présence d'amiante

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

15. Avez-vous manipulé, changé, découpé des filtres (à l'exclusion des filtres à café, des filtres à air/huile/essence des véhicules) ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP ☐ Pas sûr de la présence d'amiante

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

16. Avez-vous effectué des travaux de démolition (engins de chantiers, marteau-piqueur, ...) ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

17. Avez-vous fabriqué, utilisé ou démolé des matériaux de construction à base de silice ou des produits réfractaires, de béton, de ciments ou de mortier ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

18. Avez-vous travaillé dans la fabrication ou la démolition de fours industriels ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

19. Avez-vous effectué des travaux de peinture, pose d'enduits ou apprêts et ponçage ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

20. Avez-vous fait du sablage ou décapage de bâtiments ou de pièces métalliques au jet de sable ?

☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

21. Avez-vous été exposé à des huiles de coupe (usinage des métaux) ou de décofrage ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

22. Avez-vous travaillé dans la métallurgie du chrome ou dans le traitement de surface des métaux (chromage électrolytique) ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

23. Avez-vous travaillé dans le traitement de surface de pièces mécaniques pour certaines munitions dans la fabrication d'armement ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

24. Avez-vous effectué des opérations de soudage et de découpage à la flamme ou à l'arc électrique ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

25. Avez-vous effectué des travaux de soudure INOX ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

26. Avez-vous travaillé en cokerie au sommet des fours ou au poste d'enfourneur et régleur de portes ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

27. Avez-vous travaillé en cokerie à d'autres postes que ceux au sommet des fours ou au poste d'enfourneur ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

28. Avez-vous travaillé en sidérurgie aux hauts fourneaux à la coulée ou à la masse de bouchage ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

29. Avez-vous travaillé en sidérurgie à la réfection des convertisseurs ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

30. Avez-vous travaillé en sidérurgie au poste de garnissage de lingotières ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

31. Avez-vous travaillé en sidérurgie aux laminoirs à chaud ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

32. Avez- vous travaillé en fonderie d'acier ou de fonte en utilisant du sable « au noir » ?

☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

33. Avez- vous travaillé en fonderie d'acier ou de fonte sans utilisation de sable « au noir » ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

34. Avez-vous travaillé en fonderie de cuivre, d'étain, de zinc ou d'autres métaux légers ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

35. Avez-vous travaillé à la fabrication d'anodes précuites ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

36. Avez-vous travaillé à la fabrication d'aluminium à l'un des postes suivants : déchargement de brai, gougeonnage, brasquage ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

37. Avez-vous travaillé en fabrication d'aluminium ou en électrometallurgie par procédé électrolyse Söderberg ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

38. Avez-vous travaillé en fabrication d'anodes en graphite (aggloméré brai) à l'un des postes suivants : mélange, pesée, pressage, imprégnation, cuisson ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

39. Avez-vous travaillé en fonderie à la fabrication des moules ou des noyaux en sable ou au décochage, ébarbage ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

40. Avez-vous utilisé des huiles dans des processus chauds ? (Ex : laminage à chaud, au démoulage en fonderie, en verrerie ou en plasturgie...)

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

41. Avez-vous travaillé au revêtement de routes avec des goudrons de houille, revêtements anti-kérosène (postes : vannier, autres ?)

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

42. Avez-vous travaillé au revêtement de routes avec du bitume ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

43. Avez- vous effectué des revêtements de toiture à l'aide de produits goudronnés ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

44. Avez-vous réalisé des traitements à but d'étanchéité avec des rouleaux en aluminium goudronné ?

☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

45. Avez-vous réalisé des traitements anticorrosion de pièces métalliques avec des produits goudronnés (hors travaux d'étanchéité) ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

46. Avez-vous effectué du découpage, du ponçage, de l'usinage de pièces ayant bénéficié d'un traitement anticorrosion par des produits goudronnés ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

47. Avez-vous utilisé de la créosote pour le traitement du bois ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

48. Avez-vous travaillé dans des ateliers de trempe à l'huile ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

49. Avez-vous travaillé en industrie du caoutchouc au poste de mélange ou de vulcanisation ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

50. Avez-vous manipulé des encres grasses noires, des colorants noirs (Ex : journaux, rouleau de machine à écrire...) ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

51. Avez-vous travaillé dans l'industrie des colorants (catalyseurs, pigments) et/ou utilisé des pigments à base de chrome (jaune) ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

52. Avez-vous travaillé à la fabrication de produits pétroliers (cracking, distillation) ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

53. Avez-vous travaillé à la fabrication de boulets de charbon à l'un des postes suivants : malaxage, mélange, pressage ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

54. Avez-vous travaillé à la fabrication de boulets de charbon au poste de défumage ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

55. Avez-vous transporté / livré des boulets de charbon ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

56. Avez-vous travaillé dans la fabrication ou la préparation de peintures liquides ou en poudres ?

☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

57. Avez-vous travaillé dans la fabrication de produits de traitement du bois ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

58. Avez-vous fabriqué des céramiques, des émaux, de la porcelaine, de la poterie, de la faïencerie, des tuiles ou encore des briques ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

59. Avez-vous été en contact avec de l'argile, de l'ardoise ou de l'émail sous forme de poudres (par exemple en plasturgie, dans les peintures ou dans l'industrie du caoutchouc) ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

60. Avez-vous travaillé en verrerie, en cristallerie à la fabrication ou au meulage, gravure ou taille du verre ou cristal ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

61. Avez-vous fabriqué ou utilisé des produits abrasifs, des papiers abrasifs ou des poudres à recurer à base de silice (meulage, ponçage, polissage ...) ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

62. Avez-vous travaillé dans les mines, les carrières, ou au percement de tunnels au contact de la roche ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

63. Avez-vous effectué des travaux de découpe, d'abattage, de meulage, de perçage, de forage, de ponçage ou de polissage de pierres, roches ou béton ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

64. Avez-vous effectué de la taille, de la sculpture, du ponçage ou du sciage de roches ou pierres siliceuses (granit, grés,...) ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

65. Avez-vous travaillé dans le concassage ou le broyage de roches ou pierres siliceuses (exemple gravières) ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

66. Avez-vous travaillé à côté de moteur diesel en marche dans les mines, tunnel ou en milieux confinés ?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N°	De	à	Fréquence		N°	De	à	Fréquence
__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP		__	_ _ _ _	_ _ _ _	1--2--3--4--5--NSP

67. Avez-vous été exposé aux fumées de moteur diesel liées à la circulation automobile (ex : poste de péage, agent de circulation, ...)?

☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N° De à Fréquence | N° De à Fréquence
 _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP | _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP

68. Avez-vous travaillé à côté de moteur diesel en marche (déchargement / livraisons, entretien de poids lourds, de bus ou de machines agricoles)?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N° De à Fréquence | N° De à Fréquence
 _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP | _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP

69. Avez-vous travaillé en tant qu'ouvrier de maintenance dans l'industrie des disques de carbone?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N° De à Fréquence | N° De à Fréquence
 _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP | _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP

70. Avez-vous effectué des travaux d'entretien ou de ramonage de cheminées ou chaudières exposant aux suies de combustion du charbon?

• ☐ OUI ☐ NON ☐ NSP

N° De à Fréquence | N° De à Fréquence
 _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP | _ _ _ _ _ 1 -- 2 -- 3 -- 4 -- 5 -- NSP

4-Antécédents personnels et familiaux de cancer

4.1- Avez-vous vous-même été atteint(e) d'un autre cancer ?

☐ NON ☐ OUI

Si OUI,

	Type de cancer (organe)	Année du diagnostic	Type de traitement (plusieurs réponses possibles)
1			☐ Radiothérapie ☐ Chimiothérapie ☐ Aucun ☐ Chirurgie ☐ Je ne sais plus ☐ Hormonothérapie ☐ Autres : _____
2			☐ Radiothérapie ☐ Chimiothérapie ☐ Aucun ☐ Chirurgie ☐ Je ne sais plus ☐ Hormonothérapie ☐ Autres : _____
3			☐ Radiothérapie ☐ Chimiothérapie ☐ Aucun ☐ Chirurgie ☐ Je ne sais plus ☐ Hormonothérapie ☐ Autres : _____
4			☐ Radiothérapie ☐ Chimiothérapie ☐ Aucun ☐ Chirurgie ☐ Je ne sais plus ☐ Hormonothérapie ☐ Autres : _____

4.2-Avez-vous un jumeau(elle) ?

☐ NON ☐ OUI

Si OUI : A-t-il été atteint d'un cancer ? ☐ NON ☐ OUI

Si OUI, merci de bien préciser le type dans le tableau ci-dessous.

4.3-Des personnes de votre famille (1^{er} degré) ont-elles été atteintes d'un cancer ?

☐ NON ☐ OUI

SI OUI :

	Type de cancer (organe)	Lien de parenté Père, Mère, Frère, Sœur, Jumeau(elle)	Âge de cette personne lors du diagnostic
Personne 1			
Personne 2			
Personne 3			
Personne 4			

4.4-À votre connaissance, existe-t-il une maladie génétique dans votre famille ?

☐ NON ☐ OUI

Si OUI, Quelle est le nom de la maladie ? _____

Êtes vous atteint(e) par cette maladie ? ☐ NON ☐ OUI ☐ Je ne sais pas

4.5-Avez-vous déjà été personnellement atteint(e) ① par les maladies suivantes :

Maladie	☐	☐	Commentaire
VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine)	☐	☐	
Tuberculose	☐	☐	
Coqueluche	☐	☐	
Dilatation des bronches	☐	☐	
Emphysème	☐	☐	
Asthme	☐	☐	
Broncho-pneumopathie chronique obstructive	☐	☐	
Asbestose, plaques pleurales	☐	☐	
Silicose	☐	☐	
Fibrose pulmonaire	☐	☐	
Autre maladie pulmonaire	☐	☐	
Polyarthrite rhumatoïde ou autre rhumatisme inflammatoire chronique (hors arthrose)	☐	☐	
Lupus, autre connectivite ou vascularite	☐	☐	
Maladie de Crohn ou rectocolite hémorragique	☐	☐	
Greffe d'organe	☐	☐	Année de transplantation _____ Type d'organe _____
Cirrhose du foie	☐	☐	
Autre (1)	☐	☐	
Autre (2)	☐	☐	

① C'est-à-dire que vous avez été suivi médicalement et/ou traité pour cette maladie, y compris dans l'enfance.

4.6-Au cours de l'année écoulée combien de verres d'alcool standard avez-vous consommés en moyenne par

jour ?

_____ Verres*/j

*Verre standard d'alcool (ballon de vin, demi de 25cl de bière...)

5- Facteurs hormonaux (femmes uniquement)

5.1-Etes-vous ménopausée ?

☐ NON

☐ OUI

Si OUI, depuis quel âge ? _____ ans

5.2-A quel âge avez-vous eu vos premières règles ?

_____ ans

5.3-Combien de grossesses avez-vous eu (en incluant les fausses couches)

_____ grossesses

5.4-Combien d'enfants avez-vous ? (Enfants biologiques ; non adoptés)

_____ enfants

5.5-A quel âge avez-vous eu votre premier enfant ?

_____ ans

5.6-Avez-vous pris la pilule ?

☐ NON

☐ OUI

Si OUI^①, Nom* _____ et durée _____ ans

Nom* _____ et durée _____ ans

Nom* _____ et durée _____ ans

Nom* _____ et durée _____ ans

① Si vous avez pris plusieurs pilules, indiquez les différents noms ainsi que le nombre d'années de prise. Si vous avez arrêté puis repris la même pilule, merci d'indiquer le nombre total d'années.

*Aide disponible en fin de questionnaire

5.7-Avez-vous été traité par l'un de ces contraceptifs ?

☐ NON

☐ OUI

☐ Nuvaring® - Anneau vaginal hormonal pendant _____ ans

☐ Evra® - Dispositif transcutané pendant _____ ans

5.8-Avez-vous pris un traitement hormonal substitutif oral de la ménopause ?

☐ NON

☐ OUI

Si OUI^①, Nom* _____ et durée _____ ans

Nom* _____ et durée _____ ans

Nom* _____ et durée _____ ans

① Si vous avez pris plusieurs pilules, indiquez les différents noms ainsi que le nombre d'année de prise. Si vous avez arrêté puis repris la même pilule, merci d'indiquer le nombre total d'année.

*Aide disponible en fin de questionnaire

5.9-Avez-vous pris un traitement hormonal substitutif de la ménopause par voie transdermique ?

☐ NON

☐ OUI

Si OUI^①, Nom* _____ et durée _____ ans

Nom* _____ et durée _____ ans

Nom* _____ et durée _____ ans

5.10-Avez vous reçu une stimulation ovarienne en vue d'une grossesse (aide médicale à la procréation) ?

☐ NON ☐ OUI, une fois ☐ OUI, plusieurs fois ; précisez : _____ fois

5.11-Avez-vous été traitée par l'un des médicaments ci-dessous et combien de temps ?

- ☐ Tamoxifène, KESSAR®, NOLVADEX®, ONCOTAM®, pendant _____ ans
- ☐ Torémifène – FARESTON®, pendant _____ ans
- ☐ Fulvestrant – FASLODEX®, pendant _____ ans
- ☐ Létrozole-FEMARA®, pendant _____ ans
- ☐ Anastrozole – ARIMIDEX®, pendant _____ ans
- ☐ Exemestane - AROMASINE®, pendant _____ ans
- ☐ Hémigoxine, pendant _____ ans
- ☐ Digoxine, pendant _____ ans
- ☐ Aucun de ces médicaments

6-Habitat et habitudes de vie

6-1 Faites-vous ou faisiez vous régulièrement de la cuisine frite ou sautée (avec de l'huile chaude) dans votre vie personnelle ou professionnelle ?

☐ NON ☐ OUI

Si OUI, **Friture :**

Combien de plats **par semaine** préparez-vous _____ plats

Depuis (ou pendant) combien de temps **en tout** ? _____ années

Cuisine sautée :

Combien de plats **par semaine** préparez-vous _____ plats

Depuis (ou pendant) combien de temps **en tout** ? _____ années

Quelle huile de cuisson utilisez-vous ?

Huile 1

☐ Olive ☐ Colza
☐ Tournesol ☐ Autre _____

Pendant _____ ans

Huile 2

☐ Olive ☐ Colza
☐ Tournesol ☐ Autre _____

Pendant _____ ans

6.2-Avez-vous des passions ou des « hobbies » tels que le bricolage ou la sculpture dans lesquelles vous pourriez être exposé à de la poussière ou aux fumées ?

☐ NON ☐ OUI

Si OUI, Quelle passion/hobby _____

Combien d'heures par semaine la pratiquez vous : _____ heures

Pendant combien d'années _____ ans

6.3-Merci de préciser vos logements successifs (plus d'une année consécutive – y compris dans votre enfance)

	N°	Rue	Ville	Code postal	ys (si autre que France)	Année début	Année fin	Type de chauffage	Type de cuisson des aliments
								☐ Poêle* ☐ Cheminée* ☐ Foyer ☐ Radiateur/Chauffage collectif ☐ nspp ☐ Autre _____ ☐ Bois ☐ Charbon ☐ Electrique/gaz ☐ nspp ☐ Autre _____ Hotte : ☐ OUI ☐ NON	☐ Bois ☐ Charbon ☐ Electrique/gaz ☐ nspp ☐ Autre _____
								☐ Poêle* ☐ Cheminée* ☐ Foyer ☐ Radiateur/Chauffage collectif ☐ nspp ☐ Autre _____ ☐ Bois ☐ Charbon ☐ Electrique/gaz ☐ nspp ☐ Autre _____ Hotte : ☐ OUI ☐ NON	☐ Bois ☐ Charbon ☐ Electrique/gaz ☐ nspp ☐ Autre _____
								☐ Poêle* ☐ Cheminée* ☐ Foyer ☐ Radiateur/Chauffage collectif ☐ nspp ☐ Autre _____ ☐ Bois ☐ Charbon ☐ Electrique/gaz ☐ nspp ☐ Autre _____ Hotte : ☐ OUI ☐ NON	☐ Bois ☐ Charbon ☐ Electrique/gaz ☐ nspp ☐ Autre _____
								☐ Poêle* ☐ Cheminée* ☐ Foyer ☐ Radiateur/Chauffage collectif ☐ nspp ☐ Autre _____ ☐ Bois ☐ Charbon ☐ Electrique/gaz ☐ nspp ☐ Autre _____ Hotte : ☐ OUI ☐ NON	☐ Bois ☐ Charbon ☐ Electrique/gaz ☐ nspp ☐ Autre _____
								☐ Poêle* ☐ Cheminée* ☐ Foyer ☐ Radiateur/Chauffage collectif ☐ nspp ☐ Autre _____ ☐ Bois ☐ Charbon ☐ Electrique/gaz ☐ nspp ☐ Autre _____ Hotte : ☐ OUI ☐ NON	☐ Bois ☐ Charbon ☐ Electrique/gaz ☐ nspp ☐ Autre _____
								☐ Poêle* ☐ Cheminée* ☐ Foyer ☐ Radiateur/Chauffage collectif ☐ nspp ☐ Autre _____ ☐ Bois ☐ Charbon ☐ Electrique/gaz ☐ nspp ☐ Autre _____ Hotte : ☐ OUI ☐ NON	☐ Bois ☐ Charbon ☐ Electrique/gaz ☐ nspp ☐ Autre _____
								☐ Poêle* ☐ Cheminée* ☐ Foyer ☐ Radiateur/Chauffage collectif ☐ nspp ☐ Autre _____ ☐ Bois ☐ Charbon ☐ Electrique/gaz ☐ nspp ☐ Autre _____ Hotte : ☐ OUI ☐ NON	☐ Bois ☐ Charbon ☐ Electrique/gaz ☐ nspp ☐ Autre _____
								☐ Poêle* ☐ Cheminée* ☐ Foyer ☐ Radiateur/Chauffage collectif ☐ nspp ☐ Autre _____ ☐ Bois ☐ Charbon ☐ Electrique/gaz ☐ nspp ☐ Autre _____ Hotte : ☐ OUI ☐ NON	☐ Bois ☐ Charbon ☐ Electrique/gaz ☐ nspp ☐ Autre _____

si vous avez vécu à l'étranger, merci de préciser le pays, le nom de la ville, et le code postal si possible. De même, si votre mode de chauffage ou de cuisson a changé, merci de remplir une nouvelle ligne.
 * dans les pièces à vivre (chambre à coucher, séjour)

C. Questionnaire médecin utilisé dans l'étude BioCAST.

Une fois complété, merci de faxer ce document au **04 72 67 88 72** ou l'envoyer par courrier à

Hospices Civils de Lyon, CH Lyon Sud
Pavillon Médical, Service de Pneumologie
165 Chemin du Grand Revoyet
69495 Pierre Bénite Cedex

1- Date du diagnostic du cancer broncho-pulmonaire

/ /
 J J M M A A A A

2- Quel est le type anatomopathologique de cette tumeur ^(1,2) ?

- | | |
|--|--|
| 1. Carcinome épidermoïde | 4.1.1. Carcinome neuroendocrine à grandes cellules composite |
| 2. Carcinome à petites cellules | 4.2. Carcinome basaloïde |
| 2.1. Carcinome à petites cellules combiné | 4.3. Carcinome de type lymphoépithélial |
| 3. Adénocarcinome | 4.4. Carcinome à cellules claires |
| 3.1. Adénocarcinome <i>in situ</i> (<3 cm, anciennement BAL) | 4.5. Carcinome à cellules de phénotype rhabdoïde |
| 3.1.1. Non mucineux | 5. Carcinome adénosquameux |
| 3.1.2. Mucineux | 6. Carcinome sarcomatoïde |
| 3.1.3. Mixte | 6.1. Carcinome pléomorphe |
| 3.2. Adénocarcinome à invasion minime (tumeur lépidique <3cm avec invasion < ou= 5mm) | 6.2. Carcinome à cellules fusiformes |
| 3.2.1. Non mucineux | 6.3. Carcinome à cellules géantes |
| 3.2.2. Mucineux | 6.4. Carcinosarcome |
| 3.2.3. Mixte | 6.5. Pneumoblastome |
| 3.3. Adénocarcinome invasif | 7. Tumeur carcinoïde |
| 3.3.1. A prédominance lépidique (anciennement non mucineux de type BAC, avec une invasion > 5mm) | 7.1. Typique |
| 3.3.2. A prédominance acineuse | 7.2. Atypique |
| 3.3.3. A prédominance papillaire | 8. Autre : précisez |
| 3.3.4. A prédominance micropapillaire | |
| 3.3.5. A prédominance solide avec production de mucine | |
| 3.4. Variantes d'adénocarcinome invasif | |
| 3.4.1. Adénocarcinome mucineux (anciennement BAC mucineux) | |
| 3.4.2. Cystadénocarcinome mucineux | |
| 3.4.3. Adénocarcinome colloïde | |
| 3.4.4. Adénocarcinome fœtal (bas et haut grade) | |
| 3.4.5. Adénocarcinome entérique | |
| 4. Carcinome à grandes cellules | |
| 4.1. Carcinome neuroendocrine à grandes cellules | |

BAC = Bronchiolo-alvéolaire

Notez le code de la tumeur :

Ref :

¹ Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Harris CC (Eds) : World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Thymus, Pleura and Heart. IARC Press: Lyon 2004.

² Travis WD, Brambilla E, 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(2): 244-85

3- Résultats de coloration et d'immunohistochimie

TTF-1	☐ Positif	☐ Négatif	☐ Non réalisé	☐ Autre : _____
CK-5	☐ Positif	☐ Négatif	☐ Non réalisé	☐ Autre : _____
CK-6	☐ Positif	☐ Négatif	☐ Non réalisé	☐ Autre : _____
CK-7	☐ Positif	☐ Négatif	☐ Non réalisé	☐ Autre : _____
CK-20	☐ Positif	☐ Négatif	☐ Non réalisé	☐ Autre : _____
Mucines par PAS	☐ Positif	☐ Négatif	☐ Non réalisé	☐ Autre : _____

4- Type de prélèvement tumoral ayant permis le diagnostic

1. Biopsie

- 1.1. B Bronchique par bronchoscopie
- 1.2. B Adénopathie médiastinale (médiastinoscopie ou endoscopique)
- 1.3. B Per opératoire de la tumeur primitive
- 1.4. B Microbiopsie sous scanner de la tumeur primitive
- 1.5. B Adénopathie superficielle
- 1.6. Autre : _____
- 1.7. B Métastase
 - 1.7.1. Cérébrale
 - 1.7.2. Pulmonaire
 - 1.7.3. Osseuse
 - 1.7.4. Hépatique
 - 1.7.5. Surrénalienne
 - 1.7.6. Adénopathie axillaire
 - 1.7.7. Adénopathie cervicale (non sus claviculaire)
 - 1.7.8. Autre : _____

2. Cytologie

- 2.1. C Bronchique par bronchoscopie
- 2.2. C Adénopathie médiastinale (écho-endoscopie ou autre)
- 2.3. C Tumeur primitive sous scanner
- 2.4. C Autre _____
- 2.5. C Métastase
 - 2.5.1. Cérébrale
 - 2.5.2. Pulmonaire
 - 2.5.3. Osseuse
 - 2.5.4. Hépatique
 - 2.5.5. Surrénalienne
 - 2.5.6. Adénopathie axillaire
 - 2.5.7. Adénopathie cervicale (non sus claviculaire)
 - 2.5.8. Autre : _____

Indiquez le code du prélèvement ayant permis le diagnostic

____|____|____|____|

Joindre SVP une **COPIE ANONYMISEE** du compte-rendu d'anatomopathologie ayant permis le diagnostic de CBNF.

5- Une recherche de mutation(s) et/ou une autre analyse moléculaire ont-elles été demandées ?

- ☐ NON ☐ OUI ☐ OUI dans le cadre d'un essai IFCT : _____ (précisez lequel)
- Si NON, précisez la raison**
☐ Pas d'indication ☐ Stade précoce
- ☐ Pas d'accès à une plateforme de génétique moléculaire
- ☐ Autre : _____

Si OUI, à quelle plateforme de génétique moléculaire :

- | | | | |
|---|--|---|---|
| ☐ Angers | ☐ Lille | ☐ Paris – AP HP | ☐ Strasbourg/ Mulhouse/ Colmar |
| ☐ Besançon | ☐ Limoges | ☐ Paris – Institut Curie | ☐ Toulouse |
| ☐ Bordeaux | ☐ Lyon | ☐ Poitiers | ☐ Tours |
| ☐ Brest | ☐ Marseille | ☐ Reims | ☐ Villejuif |
| ☐ Caen | ☐ Montpellier / Nîmes | ☐ Rennes | ☐ Autre |
| ☐ Clermont Ferrand | ☐ Nancy | ☐ Rouen | |
| ☐ Dijon | ☐ Nantes | ☐ St Cloud / Versailles | |
| ☐ Grenoble | ☐ Nice | ☐ St Etienne | |

Si OUI, connaissez-vous les résultats des analyses suivantes ?

	Non demandé / Non réalisé	Sauvage	Résultat non interprétable	Mutation
EGFr	☐	☐	☐	☐ Mutation exon : _____ type : _____ ☐ Mutation exon : _____ type : _____ ☐ Mutation exon : _____ type : _____ ☐ Mutation exon : _____ type : _____
HER-2/ErbB-2	☐	☐	☐	☐ Mutation exon : _____ type : _____ ☐ Mutation exon : _____ type : _____
PIK3CA	☐	☐	☐	☐ Mutation exon : _____ type : _____ ☐ Mutation exon : _____ type : _____
K-RAS	☐	☐	☐	☐ Mutation exon : _____ type : _____

				☐ Mutation exon : _____ type : _____
B-RAF	☐	☐	☐	☐ Mutation exon : _____ type : _____ ☐ Mutation exon : _____ type : _____
Réarrangement EML4-ALK	☐	☐	☐ Translocation type : _____	
Autre : _____	☐	☐	☐	☐ Mutation exon : _____ type : _____
Autre : _____	☐	☐	☐	☐ Mutation exon : _____ type : _____
Autre : _____	☐	☐	☐	☐ Mutation exon : _____ type : _____

☞ Joindre SVP une **COPIE ANONYMISEE** du compte-rendu des résultats d'analyses

6- Stade de la maladie (au diagnostic, UICC 2009)

T ___ N ___ M ___ soit un stade _____

Si métastases, précisez :

- ☐ Cérébrale ☐ Surrénalienne
☐ Pleurale ☐ Hépatique
☐ Pulmonaire ☐ Osseuse : Ostéocondensante ☐
☐ Autre : précisez _____

7- Le patient a-t-il été déclaré en maladie professionnelle ?

☐ OUI, dossier accepté ☐ OUI, dossier en attente ☐ NON ou dossier refusé ☐ NSP

8- Antécédents médicaux remarquables du patient

VEMS initial _____ mL soit _____ % de la valeur théorique

Rapport de Tiffeneau : VEMS/CVF initial X 100 = _____ %

Maladie	OUI	NON	Année du diagnostic	Commentaire
VIH	☐	☐		
Tuberculose	☐	☐		☐ Primo-infection ☐ Tuberculose-maladie
Coqueluche	☐	☐		
Dilatation des bronches	☐	☐		
Emphysème	☐	☐		
Asthme	☐	☐		
Broncho-pneumopathie chronique Obstructive	☐	☐		
Asbestose, plaques pleurales	☐	☐		
Silicose	☐	☐		
Fibrose pulmonaire	☐	☐		
Autre maladie pulmonaire (précisez)	☐	☐		
Déficit en alpha-1-antitrypsine	☐	☐		Phénotype : _____
Polyarthrite rhumatoïde ou autre arthrite inflammatoire chronique	☐	☐		☐ Utilisation méthotrexate ☐ Utilisation de sels d'or ☐ Autre pneumotoxique : _____
Lupus, autre connectivite ou vascularite	☐	☐		☐ Utilisation méthotrexate ☐ Utilisation de sels d'or ☐ Autre pneumotoxique : _____
Maladie de Crohn ou rectocolite hémorragique	☐	☐		☐ Utilisation méthotrexate ☐ Utilisation de sels d'or ☐ Autre pneumotoxique : _____

Maladie	OUI	NON	Année du diagnostic	Commentaire
Cancer 1	☐	☐		Organe _____ Type histologique _____ Traitement ☐ Radiothérapie thoracique ou pariétale ☐ Autre radiothérapie ☐ Chimiothérapie avec drogues pneumotoxiques (bléomycine, méthotrexate) ☐ Autre chimiothérapie ☐ Chirurgie ☐ Autre : _____
Cancer 2	☐	☐		Organe _____ Type histologique _____ Traitement ☐ Radiothérapie thoracique ou pariétale ☐ Autre radiothérapie ☐ Chimiothérapie avec drogues pneumotoxiques (bléomycine, méthotrexate) ☐ Autre chimiothérapie ☐ Chirurgie ☐ Autre : _____
Greffe d'organe	☐	☐		Organe _____
Cirrhose hépatique	☐	☐		
Autre (précisez)	☐	☐		
Autre (précisez)	☐	☐		

9- Commentaires libres

Merci d'écrire ici les éventuels commentaires d'intérêt ci-dessous

 **Merci de joindre à ce questionnaire :**

une COPIE ANONYMISEE du compte-rendu d'anatomopathologie ;

une COPIE ANONYMISEE du compte-rendu de la plateforme de génétique moléculaire.

Veiller à reporter le numéro d'anonymisation du patient sur ces documents avant transmission.

