



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
2012

FACULTÉ DE MÉDECINE DE NANCY

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement

dans le cadre du troisième cycle de Médecine Spécialisée

par

Marie-Pierre WISSLER

le 21 septembre 2012

**BILAN DE L'ANALYSE DU STATUT
MUTATIONNEL EGFR DE 1000 PATIENTS
ATTEINTS D'ADENOCARCINOMES
PULMONAIRES PRIS EN CHARGE PAR LA
PLATEFORME D'ONCOLOGIE MOLECULAIRE
DU CHU-CAV DE NANCY**

Examineurs de la thèse :

M. Jean-Michel VIGNAUD

Professeur

Président

M. François PLENAT

Professeur

M. Yves MARTINET

Professeur

M. Gilles GROSDIDIER

Professeur

M. Philippe JONVEAUX

Professeur

Juges

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE MÉDECINE DE NANCY

Administrateur Provisoire de l'Université de Lorraine : Professeur Jean-Pierre FINANCE

Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Henry COUDANE

Vice Doyen « Pédagogie » : Professeur Karine ANGIOI
Vice Doyen *Mission* « *sillon lorrain* » : Professeur Annick BARBAUD
Vice Doyen *Mission* « *Campus* » : Professeur Marie-Christine BÉNÉ
Vice Doyen *Mission* « *Finances* » : Professeur Marc BRAUN
Vice Doyen *Mission* « *Recherche* » : Professeur Jean-Louis GUÉANT

Asseseurs :

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| - 1 ^{er} Cycle : | Professeur Bruno CHENUÉL |
| - « Première année commune aux études de santé (PACES) et universitarisation études para-médicales » | M. Christophe NÉMOS |
| - 2 ^{ème} Cycle : | Professeur Marc DEBOUVERIE |
| - 3 ^{ème} Cycle : | |
| « <i>DES Spécialités Médicales, Chirurgicales et Biologiques</i> » | Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI |
| « <i>DES Spécialité Médecine Générale</i> » | Professeur Francis RAPHAËL |
| - Filières professionnalisées : | M. Walter BLONDEL |
| - Formation Continue : | Professeur Hervé VESPIGNANI |
| - Commission de Prospective : | Professeur Pierre-Edouard BOLLAERT |
| - Recherche : | Professeur Didier MAINARD |
| - Développement Professionnel Continu : | Professeur Jean-Dominique DE KORWIN |
| Asseseurs Relations Internationales | Professeur Jacques HUBERT |

DOYENS HONORAIRES

Professeur Adrien DUPREZ – Professeur Jean-Bernard DUREUX
Professeur Jacques ROLAND – Professeur Patrick NETTER

=====

PROFESSEURS HONORAIRES

Pierre ALEXANDRE – Jean-Marie ANDRE - Daniel ANTHOINE - Alain BERTRAND - Pierre BEY – Patrick BOISSEL
Jacques BORRELLY - Michel BOULANGE - Jean-Claude BURDIN - Claude BURLET - Daniel BURNEL
Claude CHARDOT - Jean-Pierre CRANCE - Gérard DEBRY - Jean-Pierre DELAGOUTTE - Emile de LAVERGNE
Jean-Pierre DESCHAMPS - Jean DUHEILLE - Adrien DUPREZ - Jean-Bernard DUREUX - Gérard FIEVE Jean
FLOQUET - Robert FRISCH - Alain GAUCHER - Pierre GAUCHER - Hubert GERARD
Jean-Marie GILGENKRANTZ - Simone GILGENKRANTZ - Oliéro GUERCI - Pierre HARTEMANN - Claude HURIET
Christian JANOT – Michèle KESSLER - Jacques LACOSTE - Henri LAMBERT - Pierre LANDES - Alain LARCAN
Marie-Claire LAXENAIRE - Michel LAXENAIRE - Jacques LECLERE - Pierre LEDERLIN - Bernard LEGRAS
Michel MANCIAUX - Jean-Pierre MALLIÉ – Philippe MANGIN - Pierre MATHIEU - Denise MONERET-VAUTRIN
Pierre MONIN - Pierre NABET - Jean-Pierre NICOLAS - Pierre PAYSANT - Francis PENIN - Gilbert PERCEBOIS
Claude PERRIN - Guy PETIET - Luc PICARD - Michel PIERSON - Jean-Marie POLU – Jacques POUREL
Jean PREVOT - Antoine RASPILLER - Michel RENARD - Jacques ROLAND - René-Jean ROYER - Daniel SCHMITT
Michel SCHWEITZER – Claude SIMON - Danièle SOMMELET – Jean-François STOLTZ
Michel STRICKER - Gilbert THIBAUT - Augusta TREHEUX - Hubert UFFHOLTZ - Gérard VAILLANT - Paul VERT
Colette VIDAILHET - Michel VIDAILHET - Michel WAYOFF - Michel WEBER

=====

**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS
PRATICIENS HOSPITALIERS**

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (*Anatomie*)

Professeur Gilles GROSDIDIER

Professeur Pierre LASCOMBES – Professeur Marc BRAUN

2^{ème} sous-section : (Cytologie et histologie)

Professeur Bernard FOLIGUET

3^{ème} sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)

Professeur François PLENAT – Professeur Jean-Michel VIGNAUD

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1^{ère} sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER

2^{ème} sous-section : (Radiologie et imagerie médicale)

Professeur Denis REGENT – Professeur Michel CLAUDON – Professeur Valérie CROISÉ-LAURENT

Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM – Professeur Jacques FELBLINGER

Professeur René ANXIONNAT

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER – Professeur Bernard NAMOUR

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Professeur François MARCHAL – Professeur Bruno CHENUÉL – Professeur Christian BEYAERT

3^{ème} sous-section : (Biologie Cellulaire)

Professeur Ali DALLOUL

4^{ème} sous-section : (Nutrition)

Professeur Olivier ZIEGLER – Professeur Didier QUILLIOT - Professeur Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière)

Professeur Alain LE FAOU - Professeur Alain LOZNIIEWSKI

3^{ème} sous-section : (Maladies infectieuses ; maladies tropicales)

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (Épidémiologie, économie de la santé et prévention)

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON - Professeur Francis GUILLEMIN

Professeur Denis ZMIROU-NAVIER – Professeur François ALLA

2^{ème} sous-section : (Médecine et santé au travail)

Professeur Christophe PARIS

3^{ème} sous-section : (Médecine légale et droit de la santé)

Professeur Henry COUDANE

4^{ème} sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)

Professeur François KOHLER – Professeur Éliane ALBUISSON

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Hématologie ; transfusion)

Professeur Pierre BORDIGONI - Professeur Jean-François STOLTZ – Professeur Pierre FEUGIER

2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY

Professeur Didier PEIFFERT – Professeur Frédéric MARCHAL

3^{ème} sous-section : (Immunologie)

Professeur Gilbert FAURE – Professeur Marie-Christine BENE

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

1^{ère} sous-section : (Anesthésiologie et réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence)

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Hervé BOUAZIZ

Professeur Paul-Michel MERTES – Professeur Gérard AUDIBERT – Professeur Thomas FUCHS-BUDER

2^{ème} sous-section : (Réanimation médicale ; médecine d'urgence)

Professeur Alain GERARD - Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT

Professeur Bruno LÉVY – Professeur Sébastien GIBOT

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET

4^{ème} sous-section : (Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie)

Professeur François PAILLE – Professeur Gérard GAY – Professeur Faiez ZANNAD - Professeur Patrick ROSSIGNOL

49^{ème} Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP et RÉÉDUCATION

1^{ère} sous-section : (Neurologie)

Professeur Gérard BARROCHE – Professeur Hervé VESPIGNANI
Professeur Xavier DUCROCQ – Professeur Marc DEBOUVERIE – Professeur Luc TAILLANDIER

2^{ème} sous-section : (Neurochirurgie)

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE – Professeur Olivier KLEIN
Professeur Thierry CIVIT

3^{ème} sous-section : (Psychiatrie d'adultes ; addictologie)

Professeur Jean-Pierre KAHN – Professeur Raymund SCHWAN

4^{ème} sous-section : (Pédopsychiatrie ; addictologie)

Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC – Professeur Bernard KABUTH

5^{ème} sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)

Professeur Jean PAYSANT

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE et CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Professeur Isabelle CHARY-VALCKENAERE – Professeur Damien LOEUILLE

2^{ème} sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)

Professeur Daniel MOLE - Professeur Didier MAINARD

Professeur François SIRVEAUX – Professeur Laurent GALOIS

3^{ème} sous-section : (Dermato-vénérologie)

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeur Annick BARBAUD

4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)

Professeur François DAP – Professeur Gilles DAUTEL

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIORESPIRATOIRE et VASCULAIRE

1^{ère} sous-section : (Pneumologie ; addictologie)

Professeur Yves MARTINET – Professeur Jean-François CHABOT – Professeur Ari CHAOUAT

2^{ème} sous-section : (Cardiologie)

Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIERE – Professeur Nicolas SADOUL

Professeur Christian de CHILLOU

3^{ème} sous-section : (Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)

Professeur Jean-Pierre VILLEMOT

4^{ème} sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)

Professeur Denis WAHL – Professeur Sergueï MALIKOV

52^{ème} Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF et URINAIRE

1^{ère} sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)

Professeur Marc-André BIGARD - Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI – Professeur Laurent PEYRIN-BIROULET

3^{ème} sous-section : (Néphrologie)

Professeur Dominique HESTIN – Professeur Luc FRIMAT

4^{ème} sous-section : (Urologie)

Professeur Jacques HUBERT – Professeur Pascal ESCHWEGE

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)

Professeur Jean-Dominique DE KORWIN – Professeur Pierre KAMINSKY

Professeur Athanase BENETOS - Professeur Gisèle KANNY – Professeur Christine PERRET-GUILLAUME

2^{ème} sous-section : (Chirurgie générale)

Professeur Laurent BRESLER - Professeur Laurent BRUNAUD – Professeur Ahmet AYAV

54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION

1^{ère} sous-section : (Pédiatrie)

Professeur Jean-Michel HASCOET - Professeur Pascal CHASTAGNER

Professeur François FEILLET - Professeur Cyril SCHWEITZER – Professeur Emmanuel RAFFO

2^{ème} sous-section : (Chirurgie infantile)

Professeur Michel SCHMITT – Professeur Pierre JOURNEAU – Professeur Jean-Louis LEMELLE

3^{ème} sous-section : (Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale)

Professeur Jean-Louis BOUTROY - Professeur Philippe JUDLIN – Professeur Patricia BARBARINO

4^{ème} sous-section : (Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale)

Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

55^{ème} Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU

1^{ère} sous-section : (*Oto-rhino-laryngologie*)

Professeur Roger JANKOWSKI – Professeur Cécile PARIETTI-WINKLER

2^{ème} sous-section : (*Ophthalmologie*)

Professeur Jean-Luc GEORGE – Professeur Jean-Paul BERROD – Professeur Karine ANGIOI-DUPREZ

3^{ème} sous-section : (*Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie*)

Professeur Jean-François CHASSAGNE – Professeur Etienne SIMON

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Professeur Sandrine BOSCHI-MULLER

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Professeur Jean-Marc BOIVIN

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (*Anatomie*)

Docteur Bruno GRIGNON – Docteur Thierry HAUMONT – Docteur Manuela PEREZ

2^{ème} sous-section : (*Cytologie et histologie*)

Docteur Edouard BARRAT - Docteur Françoise TOUATI – Docteur Chantal KOHLER

3^{ème} sous-section : (*Anatomie et cytologie pathologiques*)

Docteur Aude BRESSENOT

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1^{ère} sous-section : (*Biophysique et médecine nucléaire*)

Docteur Marie-Hélène LAURENS – Docteur Jean-Claude MAYER

Docteur Pierre THOUVENOT – Docteur Jean-Marie ESCANYE

2^{ème} sous-section : (*Radiologie et imagerie médicale*)

Docteur Damien MANDRY

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (*Biochimie et biologie moléculaire*)

Docteur Jean STRACZEK – Docteur Sophie FREMONT

Docteur Isabelle GASTIN – Docteur Marc MERTEN – Docteur Catherine MALAPLATE-ARMAND

Docteur Shyue-Fang BATTAGLIA

3^{ème} sous-section : (*Biologie Cellulaire*)

Docteur Véronique DECOT-MAILLERET

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (*Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière*)

Docteur Francine MORY – Docteur Véronique VENARD – Docteur Hélène JEULIN

2^{ème} sous-section : (*Parasitologie et mycologie*)

Docteur Nelly CONTET-AUDONNEAU – Madame Marie MACHOUART

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (*Epidémiologie, économie de la santé et prévention*)

Docteur Alexis HAUTEMANIÈRE – Docteur Frédérique CLAUDOT – Docteur Cédric BAUMANN

2^{ème} sous-section (*Médecine et Santé au Travail*)

Docteur Isabelle THAON

3^{ème} sous-section (*Médecine légale et droit de la santé*)

Docteur Laurent MARTRILLE

4^{ème} sous-section : (*Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication*)

Docteur Nicolas JAY

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE
2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie : cancérologie (type mixte : biologique)

Docteur Lina BOLOTINE

3^{ème} sous-section : (Immunologie)

Docteur Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT

4^{ème} sous-section : (Génétiq

Docteur Christophe PHILIPPE – Docteur Céline BONNET

**48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE,
PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique)

Docteur Françoise LAPICQUE – Docteur Marie-José ROYER-MORROT – Docteur Nicolas GAMBIER

50^{ème} Section : RHUMATOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Docteur Anne-Christine RAT

3^{ème} sous-section : (Dermato-vénérologie)

Docteur Anne-Claire BURSZTEJN

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)

Docteur Laure JOLY

**54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE,
ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

3^{ème} sous-section :

Docteur Olivier MOREL

5^{ème} sous-section : (Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale)

Docteur Jean-Louis CORDONNIER

=====

MAÎTRE DE CONFÉRENCE DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Docteur Elisabeth STEYER

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

5^{ème} section : SCIENCE ÉCONOMIE GÉNÉRALE

Monsieur Vincent LHUILLIER

40^{ème} section : SCIENCES DU MÉDICAMENT

Monsieur Jean-François COLLIN

60^{ème} section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE ET GÉNIE CIVILE

Monsieur Alain DURAND

61^{ème} section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL

Monsieur Jean REBSTOCK – Monsieur Walter BLONDEL

64^{ème} section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Mademoiselle Marie-Claire LANHERS – Monsieur Pascal REBOUL – Mr Nick RAMALANJAONA

65^{ème} section : BIOLOGIE CELLULAIRE

Mademoiselle Françoise DREYFUSS – Monsieur Jean-Louis GELLY
Madame Ketsia HESS – Monsieur Hervé MEMBRE – Monsieur Christophe NEMOS - Madame Natalia DE ISLA
Madame Nathalie MERCIER

66^{ème} section : PHYSIOLOGIE

Monsieur Nguyen TRAN

67^{ème} section : BIOLOGIE DES POPULATIONS ET ÉCOLOGIE

Madame Nadine MUSSE

PROFESSEURS ASSOCIÉS

Médecine Générale

Professeur associé Francis RAPHAEL

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Médecine Générale

Docteur Jean-Louis ADAM
Docteur Paolo DI PATRIZIO
Docteur Sophie SIEGRIST
Docteur Arnaud MASSON

=====

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Jean-Marie ANDRÉ - Professeur Daniel ANTHOINE - Professeur Pierre BEY – Professeur Patrick BOISSEL
Professeur Jean-Pierre DELAGOUTTE – Professeur Jean-Marie GILGENKRANTZ
Professeur Simone GILGENKRANTZ - Professeur Michèle KESSLER - Professeur Henri LAMBERT
Professeur Alain LARCAN - Professeur Denise MONERET-VAUTRIN – Professeur Pierre MONIN
Professeur Jean-Pierre NICOLAS - Professeur Luc PICARD - Professeur Michel PIERSON
Professeur Jacques POUREL – Professeur Jean-François STOLTZ - Professeur Michel STRICKER
Professeur Gilbert THIBAUT - Professeur Hubert UFFHOLTZ – Professeur Paul VERT
Professeur Colette VIDAILHET - Professeur Michel VIDAILHET

DOCTEURS HONORIS CAUSA

Professeur Norman SHUMWAY (1972)
Université de Stanford, Californie (U.S.A)
Professeur Paul MICHELSEN (1979)
Université Catholique, Louvain (Belgique)
Professeur Charles A. BERRY (1982)
Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)

Harry J. BUNCKE (1989)
Université de Californie, San Francisco (U.S.A)
Professeur Daniel G. BICHET (2001)
Université de Montréal (Canada)
Professeur Brian BURCHELL (2007)
Université de Dundee (Royaume Uni)

Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)
Université d'Helsinki (FINLANDE)
Professeur James STEICHEN (1997)
Université d'Indianapolis (U.S.A)
Professeur Duong Quang TRUNG (1997)
*Centre Universitaire de Formation et de
Perfectionnement des Professionnels de Santé d'Hô
Chi Minh-Ville (VIËTNAM)*
Professeur Marc LEVENSTON (2005)
Institute of Technology, Atlanta (USA)

Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)
Brown University, Providence (U.S.A)
Professeur Mamish Nisbet MUNRO (1982)
Massachusetts Institute of Technology (U.S.A)

Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)
Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)
Professeur Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS
(1996)
Université de Pennsylvanie (U.S.A)
Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)
*Research Institute for Mathematical Sciences de Kyoto
(JAPON)*

Professeur Mildred T. STAHLMAN (1982)
Vanderbilt University, Nashville (U.S.A)

Remerciements :

A notre Maître et Président de thèse,

Mr le Professeur Jean-Michel VIGNAUD

Professeur d'Anatomie et Cytologie Pathologiques

Vous nous avez fait l'honneur de nous confier ce travail et d'accepter la présidence du jury de cette thèse,

Pour votre riche enseignement et vos conseils précieux dans la réalisation de ce travail et tout au long de l'internat,

Veillez trouver ici le témoignage de notre sincère reconnaissance et de notre profond respect.

A notre Maître et Juge,

Monsieur le Professeur François PLENAT

Professeur d'Anatomie et Cytologie Pathologiques (option Biologie)

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse,

Pour votre riche enseignement dont nous avons pu bénéficier tout au long de
notre internat,

Veillez trouver ici le témoignage de notre profond respect et de
notre plus grande estime.

A nos Maîtres et Juges,

Monsieur le Professeur Yves MARTINET
Professeur de Pneumologie ; Addictologie

Vous nous avez fait l'honneur de juger cette thèse,

Veillez trouver ici le témoignage de notre profond respect et de
notre sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur Gilles GROSDIDIER
Professeur d'Anatomie

Vous nous avez fait l'honneur de juger cette thèse,

Veillez trouver ici le témoignage de notre profond respect et de
notre sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur Philippe JONVEAUX
Professeur de Génétique

Vous nous avez fait l'honneur de juger cette thèse,

Veillez trouver ici le témoignage de notre profond respect et de
notre sincère reconnaissance.

A nos Maîtres successifs,

Monsieur le Professeur Pierre LEDERLIN

Monsieur le Docteur Bernard HUTTIN

Monsieur le Professeur Jean-Michel VIGNAUD

Monsieur le Docteur Xavier MICHEL

Monsieur le Professeur PLENAT

Madame le Docteur Agnès LEROUX

Un grand merci à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail :

A toute l'équipe de la plate-forme de Biologie Moléculaire du CHU de Nancy et en particulier à Julie et Nathalie MONHOVEN, pour vos explications sur la biologie moléculaire.

A toutes les techniciennes du laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, et en particulier les techniciennes d'immunohistochimie, Claudine, Amale et Valérie, ainsi que Stéphanie LACOMME, pour votre gentillesse tout au long de la réalisation de ma thèse.

A Monsieur le Docteur Gérard ISSARTEL, Pneumologue et Président du Collège des Pneumologues de Lorraine, pour votre aide précieuse.

A Madame le Docteur Béatrice MARIE, Madame le Docteur Aude BRESSENOT et Monsieur le Docteur Guillaume GAUCHOTTE, pour vous être prêtés aux exercices.

A Monsieur le Docteur Benoît GODBERT, pour votre gentillesse et votre aide pour la clinique.

A Madame Marie-Line ERPELDING, pour votre gentillesse et votre efficacité.

A Vincent LOMBARD et Alexandre OLIVER, pour votre aide pour l'imagerie.

Au Docteur Claire BASTIEN, pour ton soutien si précieux tout au long de ma thèse et surtout dans les derniers moments critiques et pour ta grande aide lors de la rédaction !!

A tous les médecins qui ont contribué à ma formation en Anatomie et Cytologie Pathologiques, et en particulier :

Madame le Docteur Béatrice MARIE, pour votre riche enseignement au quotidien, votre gentillesse et surtout pour votre rôle dans l'attribution de ce sujet de thèse !

Madame le Docteur Jacqueline CHAMPIGNEULLE, pour votre riche enseignement et votre sincère bienveillance, qui me seront d'une aide précieuse pour mes débuts d'assistantat !

Madame le Docteur Aude BRESSENOT, pour ton soutien dans mon travail, ton émulation à la recherche, ta rigueur enseignée et surtout ta grande sympathie.

Madame le Docteur Karine MONTAGNE, pour ton riche enseignement, ton dynamisme et ta gentillesse.

Madame le Docteur Virginie CAHN, pour ton riche enseignement, ta bonne humeur et ta grande gentillesse.

Monsieur le Docteur Guillaume GAUCHOTTE, pour ta sympathie apportée tout le long de ma formation à Nancy.

Madame le Docteur Amandine ROUSSEAU, pour m'avoir donné envie, la première, de devenir pathologiste !

Madame le Docteur Agnès LEROUX, ainsi que **Monsieur le Docteur Pascal GENIN**, **Madame le Docteur Catherine BARLIER** et **Mademoiselle le Docteur Colette MIGEON**, pour votre riche enseignement et votre sympathie.

Madame le Docteur Nathalie MARCON, pour ton enseignement et surtout ta grande sympathie dont j'espère encore profiter à l'avenir.

Mademoiselle le Docteur Claire BASTIEN, pour tout le soutien lors de mes derniers stages, la préparation à devenir assistante et surtout pour les robes I-code !! Je te souhaite beaucoup de satisfaction dans ta vie privée et professionnelle future.

**Monsieur le Docteur Gérard VALANTIN, Monsieur le Docteur Philippe LEROUX,
Monsieur le Docteur Claude DEPARDIEU, Madame le Docteur EHMANN-KRIER,
Monsieur le Docteur Philippe BEUREY.**

**A toute l'équipe technique et les secrétaires du laboratoire d'Anatomie et Cytologie
Pathologiques de Central,**

**A toute l'équipe technique et les secrétaires du laboratoire d'Anatomie et Cytologie
Pathologiques de Brabois,**

**A toute l'équipe technique et les secrétaires du laboratoire d'Anatomie et Cytologie
Pathologiques du Centre Alexis Vautrin,**

Pour votre accueil chaleureux et votre sympathie dont je garderai un souvenir précieux.

Madame le Docteur Anne-Lise THOMAS et Madame le Docteur Liliane LUDWIG,
Pour votre accueil, votre indulgence et votre gentillesse.

Madame le Docteur Camille LEMARIE-DELAUNAY, pour ta grande gentillesse. Je te
souhaite beaucoup de bonheur dans ta vie privée, familiale et professionnelle future.

Charlène VIGOUROUX, pour les bons moments partagés tout le long de notre internat.
Je te souhaite beaucoup de bonheur à toi et ta famille.

**A mes co-internes, Caroline, Boidy, Jessica, John, Claire L, Claire G, Arielle,
Vincent, Catherine, et en particulier Hélène** pour ton aide apportée lors de mon dernier
semestre.

A mes parents, Jean-Claude et Elisabeth,

Papa, le jour où je suis partie en médecine, tu as eu peur mais tous les bons côtés que tu as su me transmettre (organisation, volonté, exigence,...) m'ont permis de te prouver que j'avais fait le bon choix. Il faudrait vraiment maintenant que tu me transmettes ton savoir-faire en cuisine !!

Maman, le jour où je suis partie en médecine, tu as sauté de joie ! C'est moi qui ai eu peur de ne pas trouver la spécialité qui me passionnera et me rendra heureuse comme la tienne. Grâce à notre ange, je l'ai trouvé.

Merci à vous deux pour tout le soutien apporté lors de toutes mes années d'études et tout l'amour qui m'ont permis d'être là aujourd'hui. Je suis fière de vous et vous serai toujours reconnaissante.

A mon petit frère Alex,

Je suis si fière de toi, continue à être tel que tu es ! A me faire rire avec tes déguisements du Speckbal, tes chaussures multicolores et ton petit accent bien de chez nous. Je t'aime très fort...

A mes grands-parents, Mémé, Pépé, Mamie et Papi,

Pour tous les souvenirs d'enfance qui resteront gravés (les cabanes en tissus du jardin de Sarre-Union, les promenades dans les parcs de Cronembourg, le jardin parfait de Papi, les meubles magnifiques de Pépé, les crêpes et les beignets de Mémé et les bons petits plats de Mamie...), et pour tout votre amour de grands-parents !

A mes cousins, Philippe et Line, Mimi et Dadou, et aussi Rosalie, Camille et Mathis,

Je suis fière de faire partie de votre famille et je vous aime de tout mon cœur.

A mes oncles et tantes, Annie, Jean-Claude, Pierre, Caroline, et surtout Flo de là où tu es, avec tout mon amour...

A Claire, La belle-sœur idéale ! Je suis très heureuse que tu fasses partie de la famille.

A Doris et Roland,

Pour votre accueil chaleureux, votre confiance et tout l'amour que vous me donnez. C'est un immense plaisir que de vous connaître (et il ne s'agit pas seulement des petits plats de Doris et des bonnes blagues de Roland !!).

A Julian,

Succulents plats de pâtes, concerts privés à la guitare, blagues et autres calembours, joie de vivre, générosité, douceur, expressions cultes à la Julian, font partie de la liste du bonheur que tu m'offres au quotidien. Comment te remercier assez pour m'avoir soutenue depuis le début de mon internat de Pathologie, mais aussi dans la vie au quotidien, pour avoir été aussi patient, courageux même !! Je te dédie ce travail avec tout mon amour...

A mon amie Claire, Notre amitié est un vrai trésor, je te souhaite le bonheur que tu mérites ma chérie !

Aux Alsaciens, Elo, Tony, Laeti, Jess, Manu, JB, Thib, Luc, JP, Gisèle, Philippe,

Pour votre amitié et votre accueil il y a 5 ans ! Je me réjouis de vous retrouver bientôt ! Je ne ferai pas de « spéciales dédicaces » parce que tous les bons moments passés à Stras, je les ai passés avec chacun d'entre vous. De toute façon, chacun sait pourquoi je l'aime !!

Aux Nancéiens,

Steph T, ma 1^{ère} co-interne et surtout ma 1^{ère} amie Nancéienne, merci pour ton soutien ; Steph B, merci pour tes sourires et ton amitié, précieuse pour moi : le gang S-M-S (je viens de l'inventer !!) ne doit pas disparaître !!

Seb pour ton extrême gentillesse et ta générosité ; Rémi, quand tu veux tu peux, merci pour avoir su me donner quand il le fallait, un des conseils les plus utiles pour moi !.

Eh la bande des 6, on se fait l'Alaska en 2013 ?

Mais aussi Chacha, le soleil de la bande, Cécile, ses conseils sport (bon ça ne me sert pas trop, ok) et mode (ah là oui !!), Sylvain, ses histoires rocambolesques et ses chaussures de cardiologue, Julia, son extrême douceur, Vincent, toujours partant pour la fête, Sophie, son côté dans la lune attachant, Geoffrey, bien de chez moi et Amélie, pour ses conseils mode très utiles !

Aux Th(f)ionvillois, Anne-Flo, Fred, Julie, Matthieu, Daniela, Yves, Alexia, Seb,

Chris, Merci pour votre accueil et les bons moments déjà passés ensemble.

A Malou et FOUFOU, Pour votre sincère amitié et surtout pour le concert des Foo Fighters !

A Vincent et ÉLISE, Merci les copains ! On vous aime.

SERMENT

"Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque".

Table des matières

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| RAPPELS :..... | - 1 - |
| I. Introduction :..... | - 1 - |
| II. Epidémiologie :..... | - 1 - |
| III. Etiologies [5]:..... | - 3 - |
| 1. Tabagisme :..... | - 3 - |
| 2. Facteurs environnementaux :..... | - 5 - |
| 3. Facteurs professionnels : | - 6 - |
| IV. Signes cliniques :..... | - 7 - |
| 1. Symptômes respiratoires : | - 7 - |
| 2. Symptômes en rapport avec l'extension loco-régionale :..... | - 7 - |
| 3. Symptômes extra-thoraciques : | - 7 - |
| 4. Syndromes paranéoplasiques :..... | - 7 - |
| V. Dépistage : | - 7 - |
| 1. Imagerie :..... | - 7 - |
| 2. Procédures d'échantillonnage tumoral [6] :..... | - 10 - |
| 3. Recommandations de l'INCa : | - 10 - |
| VI. Anatomie et Histologie de l'appareil respiratoire normal:..... | - 11 - |
| VIII. Classification des adénocarcinomes pulmonaires selon la classification IASLC/ATS/ERS 2009 (International Association for the Study of Lung Cancer, American Thoracic Society and European Respiratory Society) :..... | - 14 - |
| 1. Lésions pré-invasives : | - 15 - |
| 2. Adénocarcinome à invasion minimale ($\leq 3\text{cm}$, tumeur à prédominance lépidique avec $\leq 5\text{mm}$ d'invasion) :..... | - 15 - |
| 3. Adénocarcinome infiltrant :..... | - 15 - |
| 4. Variants d'adénocarcinome infiltrant :..... | - 15 - |
| IX. Description histologique des adénocarcinomes : [11]..... | - 16 - |
| 1. L'hyperplasie adénomateuse atypique : | - 16 - |
| 2. L'adénocarcinome in situ, non-mucineux ou mucineux : | - 16 - |
| 3. L'adénocarcinome avec invasion minimale :..... | - 17 - |
| 4. L'adénocarcinome infiltrant à prédominance lépidique :..... | - 18 - |
| 5. L'adénocarcinome infiltrant à prédominance acineuse :..... | - 19 - |
| 6. L'adénocarcinome infiltrant à prédominance papillaire :..... | - 19 - |
| 7. L'adénocarcinome infiltrant à prédominance micropapillaire : | - 20 - |
| 8. L'adénocarcinome infiltrant à prédominance solide avec production de mucine: - | 21 - |
| 9. L'adénocarcinome infiltrant mucineux: [12]..... | - 21 - |
| 10. L'adénocarcinome infiltrant colloïde : [12]..... | - 22 - |
| 11. L'adénocarcinome infiltrant fœtal : [12]..... | - 23 - |
| 12. L'adénocarcinome infiltrant entérique : [12]..... | - 23 - |
| X. Caractéristiques immunohistochimiques :..... | - 24 - |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| XI. Stadification (TNM UICC 2009): | - 25 - |
| XII. Traitement : | - 26 - |
| 1. CBNPC résecables et opérables : | - 26 - |
| 2. CBNPC non résecables ou patients inopérables : | - 27 - |
| 3. CBNPC métastatiques : | - 27 - |
| XIII. Plan CANCER de l'INCa : | - 27 - |
| XIV. Epithelial Growth Factor Receptor (EGFR): | - 28 - |
| 1. Le gène de l'EGFR: | - 28 - |
| 2. La famille des protéines erbB : | - 29 - |
| 3. La voie de signalisation : | - 31 - |
| 4. La modulation de l'activité de l'Epidermal Growth Factor Receptor : | - 34 - |
| 5. L'amplification du gène de l'EGFR: | - 35 - |
| 6. La surexpression de la protéine EGFR : | - 35 - |
| 7. Les mutations du gène de l'EGFR : | - 37 - |
| XV. Les autres biomarqueurs dans le cancer du poumon : | - 47 - |
| 1. KRAS : | - 47 - |
| 2. HER 2 : | - 49 - |
| 3. BRAF : | - 50 - |
| 4. PI3K: | - 50 - |
| 5. EML4-ALK : | - 51 - |
| 6. L'amplification de MET : | - 52 - |
| XVI. Les inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK) : | - 53 - |
| 1. Les molécules : | - 53 - |
| 2. En 1 ^{ère} ligne de traitement : | - 53 - |
| 3. En 2 ^e ou 3 ^e ligne ou en traitement de maintenance : | - 54 - |
| 4. Indications : | - 54 - |
| 5. Effets secondaires : | - 55 - |
| 6. Arbre décisionnel dans les CBNPC de stade IV : | - 55 - |
| 7. Mécanismes de résistance aux ITK : | - 56 - |
| MATERIEL ET METHODES | - 58 - |
| I. Sélection des patients : | - 58 - |
| 1. Origine des prélèvements : | - 58 - |
| 2. Statut clinique des patients : | - 58 - |
| 3. Type de prélèvements : | - 59 - |
| 4. Sites primaires versus secondaires : | - 60 - |
| 5. Types histologiques : | - 60 - |
| 6. Sous-types histologiques : | - 60 - |
| 7. Immunohistochimie : | - 60 - |
| II. Procédure de prise en charge des prélèvements : | - 60 - |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| III. Technique de référence : la biologie moléculaire au sein de la plateforme d'Oncologie Moléculaire du CHU De Nancy: | - 62 - |
| 1. Etape préanalytique : | - 62 - |
| 2. Extraction de l'ADN à partir de tissus fixés inclus en paraffine avec le kit NucleoSpin® FFPE DNA Macherey-Nagel™ : | - 62 - |
| 3. Protocole des techniques de biologie moléculaire : | - 66 - |
| 4. PCR en temps réel par la méthode TaqMan : | - 67 - |
| 5. PCR en temps réel avec analyse de fragments de taille : | - 69 - |
| 6. Technique de SnaPshot multiplex : | - 71 - |
| IV. Etude immunohistochimique : | - 73 - |
| 1. Principe : | - 73 - |
| 2. Cas testés : | - 74 - |
| 3. Anticorps utilisés : | - 74 - |
| 4. Protocoles : | - 75 - |
| 5. Témoins négatifs : | - 76 - |
| 6. Analyse : | - 76 - |
| 7. Coût de la technique : 73,64 euros. | - 77 - |
| V. Evaluation de la richesse tumorale : | - 77 - |
| 1. Sélection des cas : | - 77 - |
| 2. Evaluation objective : | - 77 - |
| 3. Evaluation subjective : | - 78 - |
| VI. Enquête auprès des cliniciens concernant la prescription d'inhibiteurs de la tyrosine kinase pour les patients présentant une mutation du gène de l'EGFR dans leur tumeur: - | - 78 - |
| VII. Etude statistique : | - 79 - |
| RESULTATS | - 80 - |
| I. Mutations au sein de notre population : | - 80 - |
| 1. Résultats de la technique de biologie moléculaire : | - 80 - |
| 2. Taux de mutations : | - 80 - |
| 3. Type de mutations du gène de l'EGFR : | - 80 - |
| 4. Type de mutations du gène KRAS : | - 81 - |
| 5. Type de mutations du gène HER2 : | - 81 - |
| II. Profil des patients et des tumeurs présentant une mutation de l'EGFR : | - 82 - |
| 1. Clinique : | - 82 - |
| 2. Type d'échantillons ayant supporté le diagnostic : | - 82 - |
| 3. Site du prélèvement : | - 83 - |
| 4. Tumeur : | - 83 - |
| III. Place de l'immunohistochimie (IHC) dans la détection des mutations du gène de l'EGFR: | - 85 - |
| 1. Résultats de l'IHC : | - 85 - |
| 2. Sensibilité globale : | - 88 - |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3. Sensibilité du test selon le type de mutation : | 88 - |
| 4. Spécificité : | 88 - |
| 5. Coût de la technique : | 88 - |
| IV. Intérêt de l'évaluation de la richesse tumorale lors de la phase préanalytique par les pathologistes : | 89 - |
| 1. Analyse statistique des résultats : | 89 - |
| 2. Concordance de la méthode subjective absolue en % entre 4 lecteurs : | 89 - |
| 3. Concordance entre la méthode objective et la méthode subjective absolue pour chaque lecteur : | 89 - |
| 4. Concordance de la méthode subjective semi-quantitative avec 3 seuils entre 4 lecteurs : | 90 - |
| 5. Concordance entre la méthode objective et la méthode subjective semi-quantitative avec 3 seuils pour chaque lecteur : | 90 - |
| 6. Concordance de la méthode subjective semi-quantitative avec 2 seuils entre 4 lecteurs : | 90 - |
| 7. Concordance entre la méthode objective et la méthode subjective semi-quantitative avec 2 seuils pour chaque lecteur : | 90 - |
| 8. Concordance intra-observateurs de la méthode subjective pour chaque lecteur : | 90 - |
| V. Résultats de l'enquête auprès des cliniciens sur l'indication des Inhibiteurs de la Tyrosine Kinase (ITK) : | 91 - |
| 1. Instauration du traitement par ITK : | 91 - |
| 2. Molécule prescrite : | 91 - |
| 3. Stade clinique à l'instauration du traitement : | 91 - |
| 4. Traitements antérieurs éventuels : | 92 - |
| 5. Modalités de surveillance du traitement : | 92 - |
| 6. Effets secondaires du traitement par ITK : | 92 - |
| 7. Estimation de l'efficacité du traitement par ITK : | 92 - |
| DISCUSSION | 96 - |
| I. Les mutations du gène de l'EGFR et des autres biomarqueurs en Lorraine : | 96 - |
| 1. Efficacité de la technique de biologie moléculaire : | 96 - |
| 2. Fréquence des mutations : | 97 - |
| 3. Répartition des mutations de l'EGFR : | 98 - |
| II. Profil des patients présentant une mutation de l'EGFR : | 98 - |
| III. Biologie moléculaire <i>versus</i> immunohistochimie : | 98 - |
| IV. Problématique de l'évaluation de la richesse tumorale : | 100 - |
| V. Les inhibiteurs de la tyrosine kinase chez ces patients : | 101 - |
| CONCLUSION | 103 - |
| BIBLIOGRAPHIE | 104 - |

RAPPELS :

I. Introduction :

Le cancer broncho-pulmonaire primitif est la 1^{ère} cause de mortalité par cancer en France.

L'espérance de vie à 5 ans est inférieure à 10%.

Son principal facteur de risque est le tabac.

Sur le plan histologique, on distingue 2 types principaux : les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC), 15% des cas et les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC), plus de 80% des cas.

Les CBPC sont chimiosensibles et relèvent rarement d'un traitement chirurgical.

Les CBNPC se traitent en fonction du degré d'extension, par chirurgie, radiothérapie et/ou chimiothérapie.

Les thérapies ciblées pour les patients qui peuvent en bénéficier, améliorent significativement la qualité et la durée de la survie [1].

II. Epidémiologie :

Avec 39 500 nouveaux cas par an en France, le cancer du poumon, 4^e par ordre de fréquence après le cancer du sein, le cancer colorectal et celui de la prostate, représente 10,8% de l'ensemble des cancers et regroupe 27 500 nouveaux cas annuels pour l'homme et 12 000 pour la femme.

Le taux d'incidence (standardisé monde) en 2010 est de 51,9 pour 100 000 hommes et 17,8 pour 100 000 femmes. L'âge moyen au diagnostic en 2005 est de 65 ans chez l'homme et 64 ans chez la femme.

| Homme | | | | Femme | | | |
|---------------|----------------|-----------------|----------------|---------------|----------------|-----------------|----------------|
| Incidence | | Mortalité | | Incidence | | Mortalité | |
| Nombre de cas | Taux std monde | Nombre de décès | Taux std monde | Nombre de cas | Taux std monde | Nombre de décès | Taux std monde |
| 26863 | 51.9 | 21146 | 38.6 | 10016 | 17.8 | 7724 | 12.1 |

Tableau 1 : nombre de cas et de décès et taux correspondants (standardisés monde pour 100 000 personnes-années) chez l'homme et chez la femme pour l'année 2010 en France [2]

Par contre, il est au 1er rang concernant la mortalité avec 29 100 décès annuels et représente 19,7 % des décès annuels par cancer.

En 2011, le cancer du poumon représentait 21 000 décès chez l'homme et 8 100 chez la femme. Le taux de mortalité (standardisé monde) estimé en 2011 est de 37,9 pour 100 000 hommes et 12,6 pour 100 000 femmes.

L'âge médian au décès sur la période 2004-2008 est de 68 ans chez l'homme et 69 ans chez la femme [3].

Chez l'homme, après avoir culminé lors de la période 1988-92 (en moyenne 48,3 décès pour 100 000 hommes), le taux de mortalité (standardisé monde) par cancer du poumon a diminué de manière régulière : il est passé de 48,0 à 42,9 décès pour 100 000 entre les périodes 1993-97 et 2003-07, soit une baisse de 11 %.

En revanche, le taux de mortalité féminine par cancer du poumon a augmenté de manière importante sur les vingt dernières années, passant de 4,5 à 9,5 pour 100 000 entre les périodes 1983-87 et 2003-07, soit une augmentation de 111 %.

Les tendances par âge montrent également une baisse du taux masculin de mortalité lors de la décennie récente (entre les périodes 1993-97 et 2003-07) pour l'ensemble des classes d'âge.

Chez la femme, l'augmentation continue du taux de mortalité est observée sur l'ensemble des classes d'âge. Ces évolutions contrastées de la mortalité masculine et féminine par cancer du poumon reflètent pour une grande part, l'entrée plus récente des femmes dans le tabagisme (à la fin des années 60) et le déclin important du tabagisme chez l'homme qui a fait baisser l'incidence du cancer masculin du poumon en France depuis 2000 [2].

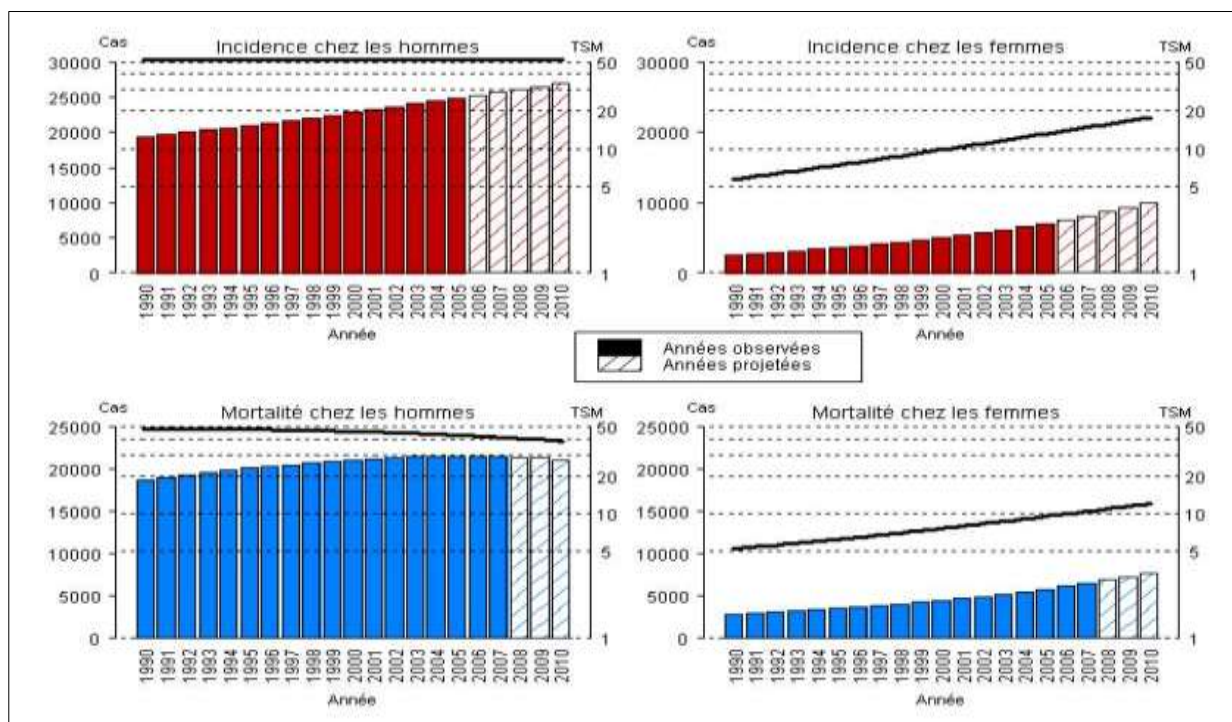


Figure 1 : évolution du nombre de cas et de décès (barres) et des taux standardisés monde correspondants (TSM) (courbe, échelle logarithmique) chez l'homme et chez la femme de 1990 à 2010 en France[2]

La survie est de l'ordre de 10% à 5 ans. La survie relative (diagnostics portés entre 1989 et 1997) est de :

- Globale à 1 an = 43 %, à 5 ans = 14 %.
- Homme à 1 an = 42 %, à 5 ans = 13 %.
- Femme à 1 an = 46 %, à 5 ans = 18 %.

Selon les données américaines, le taux de survie relative à 5 ans des patients diagnostiqués en 1999-2005 est estimé à 52,6% pour le stade local contre 3,5 % pour le stade métastatique.

La seule chance de guérison reste la chirurgie mais seuls 20 à 25% des patients au moment du diagnostic peuvent en bénéficier. De plus même chez les patients opérés, l'espérance de vie reste limitée avec un taux de survie à 5 ans de 40%.

La mortalité élevée est due au diagnostic tardif, aux absences d'outils de détection précoce et à l'échec des thérapeutiques cytotoxiques conventionnelles [4].

III. Etiologies [5]:

1. Tabagisme :

La relation causale entre le cancer du poumon et le tabagisme fut avancée pour la 1^{ère} fois en 1898 et ensuite clairement démontrée dans des études de cohorte dans les années 1950 et 1960. L'International Agency for Research on Cancer (IARC) estima que dans les populations avec une consommation tabagique prolongée, la proportion de cancers du poumon dus au tabagisme était de plus de 90 %. Selon les études menées en Europe, au Japon et en Amérique du Nord, 91 % des cancers du poumon chez les hommes et 69 % chez les femmes étaient attribuables au tabagisme.

Le risque de cancer du poumon chez les fumeurs dépend de différents aspects du comportement tabagique, notamment la durée du tabagisme, la quantité de cigarettes fumées, le type de cigarette fumée et le type d'inhalation.

Le tabagisme cause des changements génétiques dans les cellules pulmonaires, qui conduisent au développement du cancer. Plus de 4000 substances chimiques ont été identifiées dans la fumée de cigarette. Environ 2500 proviennent du tabac naturel transformé, tandis que le reste provient des additifs, pesticides et autres composants métalliques et organiques. Les carcinogènes connus incluent les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAHs), les N-nitrosamines, les amines aromatiques, les aldéhydes, les composants organiques (ex : benzène, chlorure de vinyle) et les composants inorganiques (ex : arsenic, chrome, radon, plomb 210, polonium 210). Les hydrocarbures aromatiques

polycycliques et les nitrosamines spécifiques au tabac sont les carcinogènes les plus puissants dans la fumée de tabac.

Les concentrations de nombreux carcinogènes dans la fumée principale (c'est-à-dire inhalée) sont au-dessus du niveau de concentration qui serait fatal avec une exposition ininterrompue, mais la dilution de la fumée dans l'air et l'intermittence de l'inhalation préviennent d'une létalité immédiate.

Le dépôt des particules contenant les PAHs, polonium 210 ou lead 210 dans les bronches souches est associé au développement des carcinomes épidermoïdes, tandis que l'inhalation plus profonde des nitrosamines volatiles aboutit à leur dépôt dans les bronchioles terminales et alvéoles et ainsi au développement des adénocarcinomes.

La durée du tabagisme est le plus fort déterminant dans le risque du cancer du poumon chez les hommes et les femmes. Un âge précoce de début du tabagisme est donc associé à un risque élevé de cancer du poumon au cours de la vie.

L'intensité ou la quantité de cigarettes fumées est aussi significative, mais pas autant que le nombre d'années de tabagisme.

L'hypothèse de la diminution du risque avec les cigarettes avec faible teneur en goudrons reste controversée. Le rapport de l'U.S. Surgeon General établit que même si les caractéristiques des cigarettes avaient changé durant les 50 dernières années, le risque de cancer du poumon chez les fumeurs n'avait pas diminué. Tandis que la teneur en goudrons était passée de 35 mg dans les années 1950 à 10 mg dans les années 1980 et que de nombreux consommateurs fumaient des cigarettes avec filtre, l'inhalation plus profonde et l'intensité croissante du tabagisme (plus de cigarettes par jour et plus de bouffées par cigarette) rendaient les études difficiles à interpréter. Cependant le risque de cancer est plus important chez les consommateurs de cigarettes sans filtre que ceux avec filtre. De plus, le risque de cancer n'est pas différent chez les personnes fumant des cigarettes à teneur moyenne en goudrons (15-21 mg), que chez les personnes fumant des cigarettes à teneur faible en goudrons (8-14 mg) ou même minimale (≤ 7 mg). Le risque de cancer avec les cigarettes mentholées est équivalent à celui des cigarettes non mentholées. Les cigarettes américaines présentant d'une part une diminution très médiatisée du taux de goudrons (contenant les PAHs) et nicotine, ont en fait une augmentation d'autres carcinogènes dans leur composition, notamment les N-nitrosamines spécifiques du tabac.

Enfin les études ont montré un risque accru avec une inhalation profonde comparativement aux inhalations moyennes ou légères.

Le tabagisme augmente le risque de cancers du poumon, que ce soit les CBNPC ou les CBPC. L'association est très forte avec les carcinomes épidermoïdes et les CBPC. Mais

l'association entre les adénocarcinomes et le tabagisme a beaucoup augmenté lors des dernières décennies. L'inhalation plus profonde et l'inhalation plus fréquente de cigarettes à basse teneur en goudrons et nicotine avec un dépôt distal plus élevé de carcinogènes incluant les N-nitrosamines pourraient être responsables de l'ascension inévitable de la fréquence des adénocarcinomes.

Le risque de cancer du poumon chez les anciens fumeurs est plus élevé que chez les non-fumeurs même si ce risque diminue avec les années d'abstinence. Le bénéfice de l'arrêt du tabac devient significatif approximativement 5 ans après l'arrêt et diminue avec le temps.

Depuis que les cigares sont enrobés de tabac, contrairement aux cigarettes, la fumée de cigare comporte une teneur plus élevée en nicotine, benzène, PAHs, cyanure d'hydrogène, N-nitrosamines, ammonium et monoxyde de carbone, que dans la fumée de cigarettes. La fumée de cigare amène à un pH plus élevé qu'avec celle des cigarettes, ce qui non seulement, augmente le taux de nicotine libre dans les particules et dans la vapeur de fumée, mais aussi facilite l'absorption de nicotine à travers les muqueuses buccales et nasales. Le risque de cancer avec cigares et cigarillos n'est donc pas négligeable même s'il est inférieur à celui des cigarettes.

La consommation de cannabis serait aussi un facteur de risque de cancer du poumon. En effet, la cigarette de cannabis dépose 5 fois plus de goudrons dans le tractus respiratoire qu'une cigarette avec filtre de taille équivalente et contient de nombreux carcinogènes dont les PAHs et phénols à concentration plus élevée que dans la cigarette.

Le tabagisme passif est également un facteur de risque et est responsable de plus de 3000 cas (20 %) de cancer du poumon par an chez les Américains et Américaines non-fumeurs. Le tabagisme passif inclut la fumée secondaire (80 %) due aux produits de combustion du tabac et la fumée principale (20 %) exhalée par les fumeurs. La fumée secondaire contient des concentrations en carcinogènes (ex : nitrosamines, benzo(a)pyrène) et autres toxiques plus élevées que dans la fumée principale.

2. Facteurs environnementaux :

Tandis que les catégories de radioactifs incluant le radon 222, lead 210 et le polonium 210 sont connues pour être des carcinogènes dans la fumée de tabac, l'inhalation de radon, gaz naturel radioactif omniprésent dans l'environnement et provenant du centre de la Terre, est considérée comme la 2^e cause de cancer du poumon aux Etats-Unis. Le rapport de la National Academy of Science de 1998 attribue 15 000 à 20 000 cas (10-15 %) et décès annuels de cancer du poumon aux Etats-Unis, à l'exposition permanente de radon. Les études

épidémiologiques suggèrent que le radon pourrait être responsable de 20 % des cancers en Suède, 7 % en Allemagne et 4 % aux Pays-Bas.

Il existe 35 isotopes de radon connus jusqu'à ce jour, mais seuls 4 d'entre eux existent dans la nature, à l'état de trace. L'isotope le plus fréquent (et relativement le plus "stable") est le radon 222 qui est le produit (isotope-fils) de la désintégration du radium 226 de la série de l'uranium 238. Il a une demi-vie de 3,823 jours et émet des particules alpha. Étant d'une importante durée de vie (3,8 jours), le radon 222 est un gaz extrêmement radioactif, causant des altérations du tractus respiratoire. Le premier site d'exposition est la maison dans laquelle le radon pénètre par la terre à travers les fentes des fondations. Les effets de l'interaction entre l'exposition au radon et le tabagisme apparaissent plus additifs.

Même si le tabagisme et le radon sont les principales causes de cancer du poumon, la pollution de l'air intérieur et extérieur inquiète également la santé publique. Un homme adulte inhale plus de 10 000 litres d'air par jour. Les carcinogènes relargués par les industries, les centrales électriques, les véhicules motorisés, les matériaux de chauffage dont le bois et le charbon, contaminent l'air extérieur. Les données suggèrent qu'1 à 2 % des cancers du poumon sont directement attribuables à la pollution de l'air. La pollution de l'air intérieur est divisée en 4 classes : produits de combustion, substances chimiques, radon et substances biologiques. Les sources de combustion incluent le tabagisme passif, mais aussi les produits de combustion des cuisinières et chauffages, surtout dans les pays en voie de développement.

3. Facteurs professionnels :

La distinction entre exposition professionnelle et exposition environnementale aux carcinogènes est faite en fonction de la proportion des produits dans l'environnement et la profession. Il est parfois difficile de prouver une origine professionnelle, c'est pourquoi l'IARC lista les agents professionnels considérés comme carcinogènes.

L'association entre l'exposition à l'amiante lourde et le carcinome du poumon est acceptée universellement. Les études épidémiologiques ont pu démontrer une relation dose-effet entre l'exposition à l'amiante et le risque de cancer du poumon. Le risque relatif de cancer augmente de 0,5 % à 4 % pour une exposition cumulée d'une fibre par cm² par an (fibre-année).

L'exposition à l'amiante agit de façon synergétique avec le tabagisme. En effet celui-ci semble augmenter la pénétration des fibres d'amiante à travers la muqueuse bronchique et interférer avec la clairance des fibres. Les fibres d'amiante peuvent activer la protéine kinase C et activer les proto-oncogènes c-fos et c-jun comme l'expression de gènes dépendant du

facteur nucléaire NF- κ B et le proto-oncogène c-myc. Moins de 2 % des cas de cancer du poumon sont liés à l'amiante.

IV. Signes cliniques :

1. Symptômes respiratoires :

Toux persistante, expectoration hémoptoïque, bronchorrhée, dyspnée, douleur thoracique, tableau d'infection respiratoire basse...

2. Symptômes en rapport avec l'extension loco-régionale :

Pleurésie, dysphonie, syndrome cave supérieur, syndrome de Pancoast-Tobias, paralysies phréniques, wheezing, dysphagie, tamponnade, arythmie cardiaque...

3. Symptômes extra-thoraciques :

Altération de l'état général, anorexie, amaigrissement, une pathologie thrombo-embolique, une métastase ganglionnaire notamment sus- ou sous-claviculaire ou une métastase viscérale à distance, notamment cérébrale, surrénalienne, hépatique, osseuse, ...

4. Syndromes paranéoplasiques :

Hippocratisme digital, hypercalcémie paranéoplasique, hyponatrémie du syndrome de Schwartz-Bartter, syndrome de Cushing...

Les signes peuvent être parfois discrets ou tardifs. Tout signe clinique, indépendamment de son importance doit être un signal d'alarme chez un fumeur de plus de 40 ans.

V. Dépistage :

1. Imagerie :

a) Radiographie du thorax :

Elle consiste en 2 clichés de face et profil. Les images suspectes sont les images à projection hilare ou juxta-hilaire, les opacités arrondies intra-parenchymateuses, les opacités systématisées rétractiles, les images cavitaires néoplasiques.

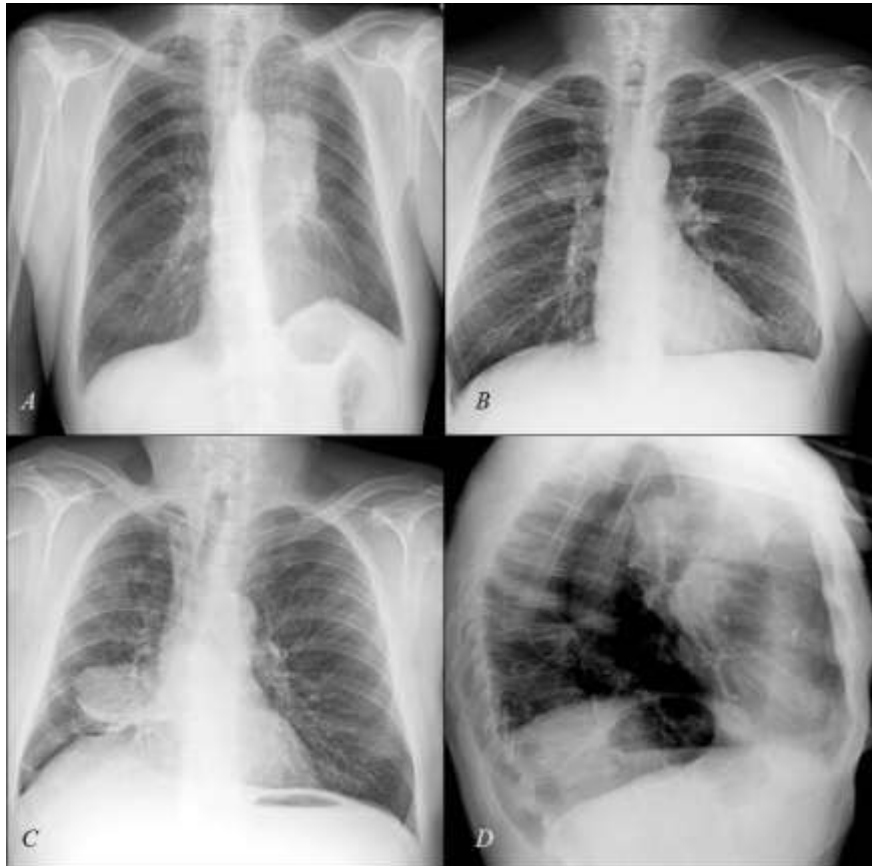


Figure 2 : A, B, C : radiographies du thorax de face: A : opacité hilare gauche, B : opacité juxta-hilaire droite, C : opacité arrondie intra-parenchymateuse droite, D : radiographie du thorax de profil : atélectasie

b) Tomodensitométrie thoracique avec injection (=scanner, TDM) :

Il s'agit de l'outil de base pour le bilan d'extension du cancer avec notamment la réalisation du stade TNM (voir figure 21). Cet examen se fait préférentiellement avant l'endoscopie pour orienter au mieux les prélèvements et donc augmenter sa sensibilité.

Elle précise les caractéristiques de la tumeur :

- ✓ la taille,
- ✓ la topographie hilare, centrale ou périphérique,
- ✓ le caractère systématisé, rétractile ou non rétractile,
- ✓ les rapports avec les structures avoisinantes du thorax, de la plèvre et du médiastin.

Et l'extension lymphatique :

- ✓ aux ganglions hilaires (aires 10R-L et 11R-L) ou péribronchiques homolatéraux (12R-L, 13R-L et 14R-L) = N1,
- ✓ aux ganglions médiastinaux (2, 3, 4, 5, 6 R-L et 8, 9R-L) et sous-carénaux homolatéraux (7) = N2,

- ✓ aux ganglions médiastinaux ou hilaires controlatéraux ou les ganglions sus-claviculaires (1R-L) = N3.

Pour l'extension métastatique à distance, elle permet, grâce à un scanner thoraco-abdomino-pelvien et cérébral, de préciser la présence de métastases hépatiques, surrenaliennes, osseuses, cérébrales etc...

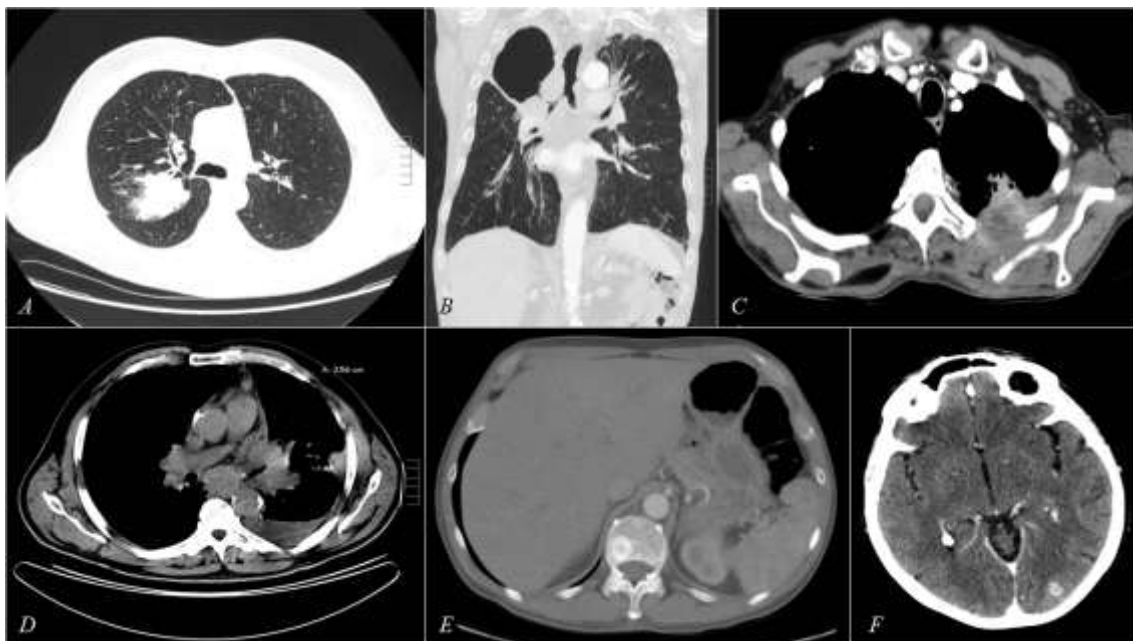


Figure 3: images tomodensitométriques : A : taille de la tumeur (coupe axiale), B : lésion excavée (coupe frontale), C : extension à la paroi thoracique (coupe axiale) ; D (coupe axiale) : adénopathies hilaires droites et sous carinaires ; E (coupe axiale) : métastase osseuse vertébrale ; F (coupe axiale) : métastase cérébrale occipitale gauche

c) Tomographie par émission de positons au ^{18}F FDG (TEP) :

Elle est surtout indiquée pour le bilan d'extension régionale dans les ganglions médiastinaux et le bilan d'extension à distance pour une tumeur résécable sauf si des métastases sont déjà visibles sur le scanner thoraco-abdominal et cérébral. Cet examen a une bonne valeur prédictive négative mais une moins bonne spécificité (80%) [6].

d) Recommandations de l'Institut National du Cancer (INCa):

L'INCa recommande de réaliser une radiographie du thorax (face et profil), une TDM thoracique avec injection si la radiographie est suspecte et avec coupes abdominales s'il existe une forte suspicion. En cas de forte suspicion, une bronchoscopie souple est indiquée [7].

2. Procédures d'échantillonnage tumoral [6] :

a) Bronchoscopie souple (= fibroscopie bronchique) :

Celle-ci est idéale pour les tumeurs centrales avec lésions endobronchiques suspects accessibles. Les adénopathies médiastinales (2, 3, 4, 5, 6R-L et 8, 9R-L) initialement abordées par ponction à l'aiguille à l'aveugle (aiguilles de Wang) le sont maintenant sous guidage d'une sonde d'échographie (= échoendoscopie bronchique/EBUS).

b) Ponction-biopsie transpariétale à l'aiguille : sous guidage scannographique, idéale pour les lésions périphériques.

c) Thoracoscopie : en cas d'épanchement pleural exsudatif.

d) Médiastinoscopie : pour l'abord des sites ganglionnaires latéro-trachéaux et des ganglions de la loge de Baretty.

e) Vidéo-thoracotomie exploratrice à visée diagnostique : pour l'abord des sites ganglionnaires médiastinaux antérieurs et en cas de contre-indications aux autres techniques.

f) Ponction-biopsie ou exérèse d'une lésion à distance : en cas de métastases à distance.

3. Recommandations de l'INCa :

a) Bilan diagnostique :

Le diagnostic est confirmé par l'examen anatomopathologique, préférentiellement par une histologie plutôt qu'une cytologie. Il est envisagé en premier lieu une bronchoscopie souple. Si la bronchoscopie souple est non contributive, il sera réalisé une ponction transpariétale si la taille et la localisation de la lésion le permettent.

L'envoi de matériel tumoral à la plateforme d'Oncologie Moléculaire est indiquée dans les cas de carcinome non à petites cellules non épidermoïde devant une tumeur localement avancée ou métastatique. Il y sera recherché les mutations du gène de l'EGFR ainsi que celles des biomarqueurs émergents : KRAS, BRAF, HER2, PI3KCA et la translocation EML4-ALK [7].

b) Bilan d'extension :

- Pour une tumeur accessible à un traitement loco-régional :

Concernant l'évaluation du statut tumoral T, il est réalisé une TDM thoracique avec injection, une bronchoscopie souple avec biopsies des éperons adjacents, une Imagerie par Résonance Magnétique thoracique (option) s'il s'agit d'une tumeur de l'apex et une échographie cardiaque endo-oesophagienne s'il existe un doute sur une atteinte atriale.

Concernant l'évaluation du statut ganglionnaire N, il est réalisé un TEP-TDM et une exploration médiastinale avec biopsie en cas d'hypermétabolisme ganglionnaire médiastinal ou faisant suspecter un caractère N2 ou N3 (ganglions médiastinaux mesurant plus de 16mm au TDM). Cette exploration se fait par médiastinoscopie ou ponction-biopsie transbronchique échoguidée ou non.

Concernant l'évaluation du statut métastatique M, il est réalisé une imagerie cérébrale (scanner ou IRM), un scanner abdominal et un TEP-TDM associé à une confirmation histologique de toute métastase susceptible de modifier le traitement.

- Pour une tumeur non accessible à un traitement loco-régional :

Le TEP-TDM n'est pas indiqué, l'imagerie cérébrale est à discuter et devant des signes d'appel, les examens complémentaires sont réalisés en fonction des possibilités thérapeutiques.

VI. Anatomie et Histologie de l'appareil respiratoire normal:

La respiration est un processus par lequel les structures assurant cette fonction, permettent un échange gazeux nécessaire pour le maintien de la respiration à l'échelle cellulaire.

La fonction respiratoire est assurée par l'appareil respiratoire qui est formé de deux constituants principaux:

- un système de conduction permettant le transfert et le conditionnement de l'air inspiré jusqu'au milieu d'échange ;
- le milieu d'échange qui est le tissu pulmonaire

L'appareil respiratoire se divise en deux parties séparées par le pharynx : les voies aériennes supérieures et l'appareil broncho-pulmonaire.

Les voies aériennes supérieures comprennent une série de cavités communicantes: le nez, les sinus, le rhinopharynx. Ces voies formées de structures tubulaires flexibles, filtrent, humidifient et régulent la température de l'air inspiré. Par ailleurs, la cavité nasale contient les récepteurs de l'olfaction, et les sinus (cavités localisées dans les structures osseuses de la face) se comportent comme des caisses de résonance pour la parole, et contribuent à la réduction de la masse osseuse du squelette de la face.

L'appareil broncho-pulmonaire commence par le larynx, et se continue par la trachée dans le thorax, pour se diviser en deux bronches primaires ou principales. Ces dernières se divisent en branchements (une vingtaine) pour se terminer dans les alvéoles.

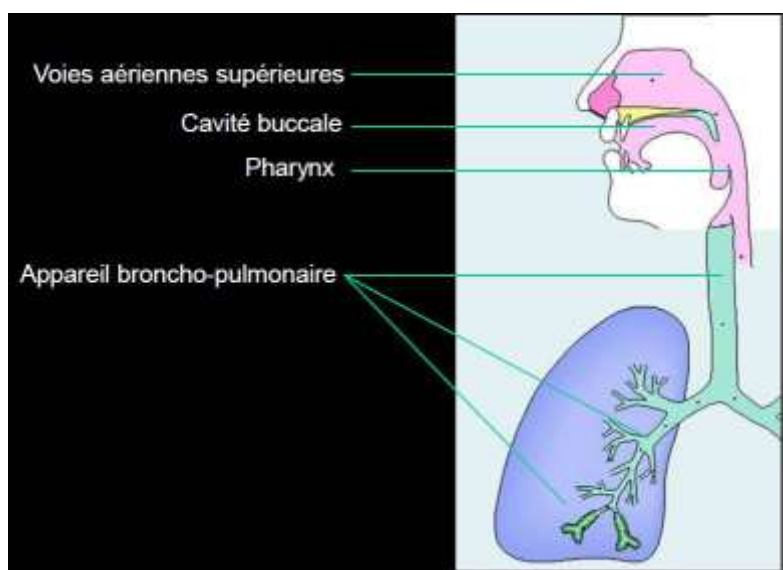


Figure 4 : anatomie de l'arbre respiratoire [8]

Les poumons sont constitués de deux formations situées latéralement dans la cavité thoracique, séparées par le médiastin. Ils reposent sur le diaphragme qui délimite la cavité abdominale supérieure. Les poumons sont des structures rose-grisâtres, très résistantes et élastiques. Ils sont séparés des organes intra-thoraciques par une séreuse, la plèvre, qui permet leur glissement lors des mouvements respiratoires. Les poumons sont constitués de deux lobes à gauche et trois à droite, séparés par des scissures. Au niveau des hiles pulmonaires, les structures bronchiques et vasculaires pénètrent dans le tissu pulmonaire et s'effectue la réflexion de la séreuse pleurale.

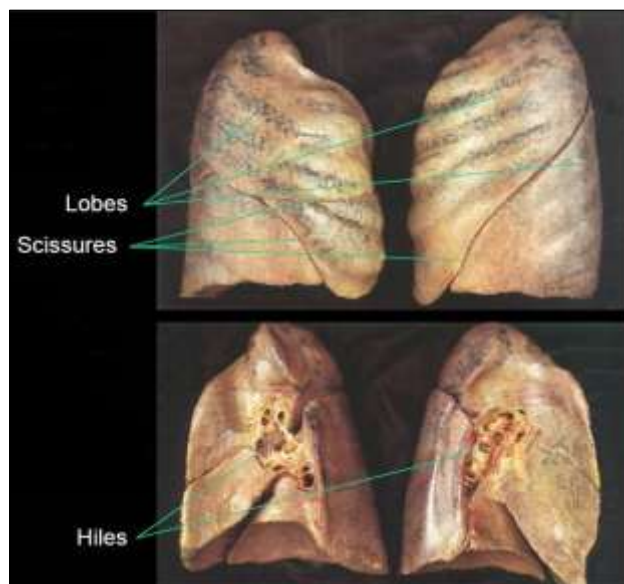


Figure 5 : anatomie des poumons [8]

Le tissu pulmonaire est macroscopiquement homogène spongieux. La teinte rose habituellement due à la perfusion du tissu, est modifiée par la fixation de la pièce, et le taux d'exposition aux agents polluants divers. La partie distale terminale des voies de conduction est la bronchiole terminale. Cette dernière se divise en ramifications courtes appelées bronchioles respiratoires car leur paroi contient des alvéoles. Chaque bronchiole respiratoire se divise en segments appelés canaux alvéolaires sur lesquels s'ouvrent des sacs alvéolaires et des alvéoles.

Tout l'arbre respiratoire, du larynx sous-glottique jusqu'aux bronchioles terminales, est tapissé par un revêtement respiratoire pseudostratifié cilié associant trois types cellulaires principaux : des cellules épithéliales ciliées, des cellules mucosécrétantes et des cellules basales. La muqueuse bronchique contient aussi de rares cellules neuro-endocrines porteuses de granules de type neuro-sécrétoire. De nombreuses glandes sous-muqueuses mucosécrétantes sont distribuées tout le long de l'axe trachéo-bronchique à l'exception des bronchioles.

La bronchiole terminale possède un revêtement cylindrique cilié dépourvu de cellules caliciformes, contenant de rares cellules non ciliées appelées cellules de Clara. Ces dernières forment le type cellulaire principal de l'épithélium des bronchioles respiratoires [8].

Les parois alvéolaires (cloisons ou septums alvéolaires) sont constituées, en allant du sang vers l'air alvéolaire, des éléments suivants : l'endothélium capillaire, une membrane basale, le tissu conjonctif et l'épithélium alvéolaire. Dans les lumières alvéolaires, les macrophages alvéolaires appartenant au système phagocytaire mononucléé, contiennent souvent des particules anthracosiques ou autres éléments phagocytés chez les tabagiques.

Le tissu conjonctif voisin forme dans les parties les plus épaisses des cloisons alvéolaires, l'espace interstitiel, contenant de fines fibres élastiques, de petits trousseaux de fibres collagènes, de rares cellules fibroblastiques, musculaires lisses, des mastocytes et de très rares lymphocytes et histiocytes. Les cloisons alvéolaires ne sont pas continues mais perforées par de multiples pores de Kohn.

L'épithélium alvéolaire est formé d'une couche continue de cellules, de deux principaux types : les pneumocytes de type I (ou pneumocytes membraneux ou cellules de Clara) aplatis, tapissant 95% de la surface alvéolaire et les pneumocytes de type II responsables de la synthèse de surfactant. Ce dernier est un agent tensio-actif, qui, en réduisant la tension superficielle, empêche l'alvéole de se collaber. Le pneumocyte de type II possède un noyau volumineux nucléolé, et un cytoplasme éosinophile abondant avec de fines vacuoles claires [9].

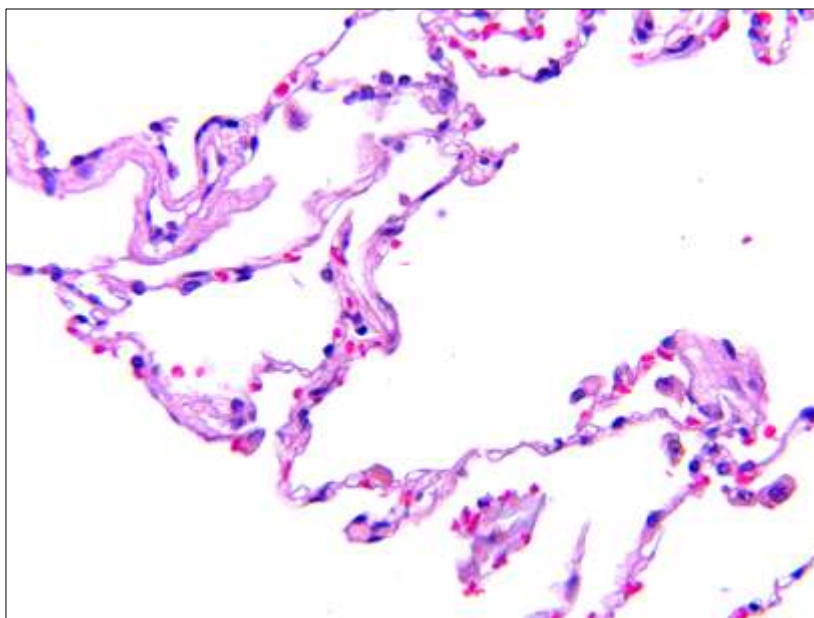


Figure 6 : alvéoles dont les septums sont tapissés par des pneumocytes de type I et II ; présence de macrophages pigmentés dans la lumière (HES x 400)

VIII. Classification des adénocarcinomes pulmonaires selon la classification IASLC/ATS/ERS 2009 (International Association for the Study of Lung Cancer, American Thoracic Society and European Respiratory Society) :

La nouvelle classification histologique IASLC/ATS/ERS, qui préfigure la nouvelle classification OMS à venir (prévue pour 2014), a été créée dans le but de définir des

catégories auxquelles se rattachent les critères cliniques, radiologiques, moléculaires et histologiques. Il s'agit de mieux définir les critères pronostiques, prédictifs de réponse aux différentes thérapies ainsi que les cibles thérapeutiques [10].

Pour cela de nouvelles entités ont été créées comme l'adénocarcinome in situ ou l'adénocarcinome avec invasion minimale, et d'autres ont été supprimées comme le sous-type mixte.

1. Lésions pré-invasives :

- Hyperplasie adénomateuse atypique (HAA)
- Adénocarcinome in situ (≤ 3 cm et anciennement carcinome bronchioalvéolaire (BAC)) :
 - non mucineux,
 - mucineux,
 - mixte mucineux/non mucineux.

2. Adénocarcinome à invasion minimale (≤ 3 cm, tumeur à prédominance lésionnelle avec ≤ 5 mm d'invasion) :

- non mucineux,
- mucineux,
- mixte mucineux/non mucineux.

3. Adénocarcinome infiltrant :

- A prédominance lésionnelle (anciennement profil BAC non mucineux, avec > 5 mm d'invasion),
- A prédominance acineux,
- A prédominance papillaire,
- A prédominance micropapillaire,
- A prédominance solide avec production de mucine.

4. Variants d'adénocarcinome infiltrant :

- Adénocarcinome mucineux infiltrant (anciennement BAC mucineux),

- Colloïde,
- Fœtal (bas et haut grade),
- Entérique.

IX. Description histologique des adénocarcinomes : [11]

1. L'hyperplasie adénomateuse atypique :

Il s'agit d'une prolifération tumorale localisée, habituellement inférieure à 5mm, de pneumocytes de type II ou de cellules de Clara, légèrement à modérément atypiques, tapissant les cloisons alvéolaires et parfois les bronchioles respiratoires. Il existe un écart entre ces cellules cubiques ou cylindriques, parfois en clou de tapissier avec un noyau rond à ovale. Les inclusions intranucléaires sont assez fréquentes. Les mitoses sont rares et les cellules plurinucléées sont communes.

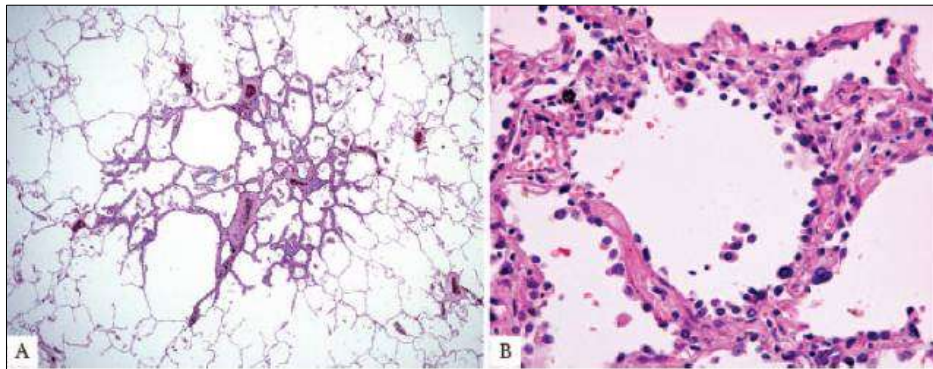


Figure 7: hyperplasie adénomateuse atypique (HES A : x 12,5 ; B : x 200)

2. L'adénocarcinome in situ, non-mucineux ou mucineux :

Il s'agit d'une prolifération adénocarcinomateuse localisée, de petite taille, ≤ 3 cm avec une prolifération des cellules tumorales le long des parois alvéolaires (mode lépidique), sans invasion stromale, vasculaire ou pleurale. Le type non-mucineux provient des pneumocytes de type II ou des cellules de Clara et le type mucineux, moins fréquent, présente des cellules cylindriques avec un noyau basal et un cytoplasme mucosécrétant, parfois sous forme de véritables cellules caliciformes à mucus. Les atypies nucléaires sont de modérées à marquées. Il existe un discret épaissement fibreux des septums.

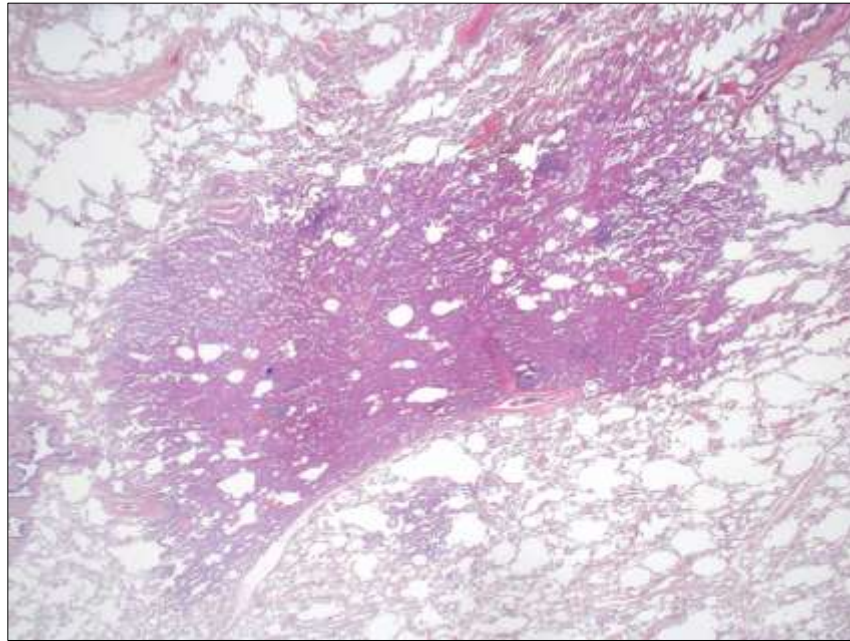


Figure 8: adénocarcinome in situ non mucineux (HES x 12,5)

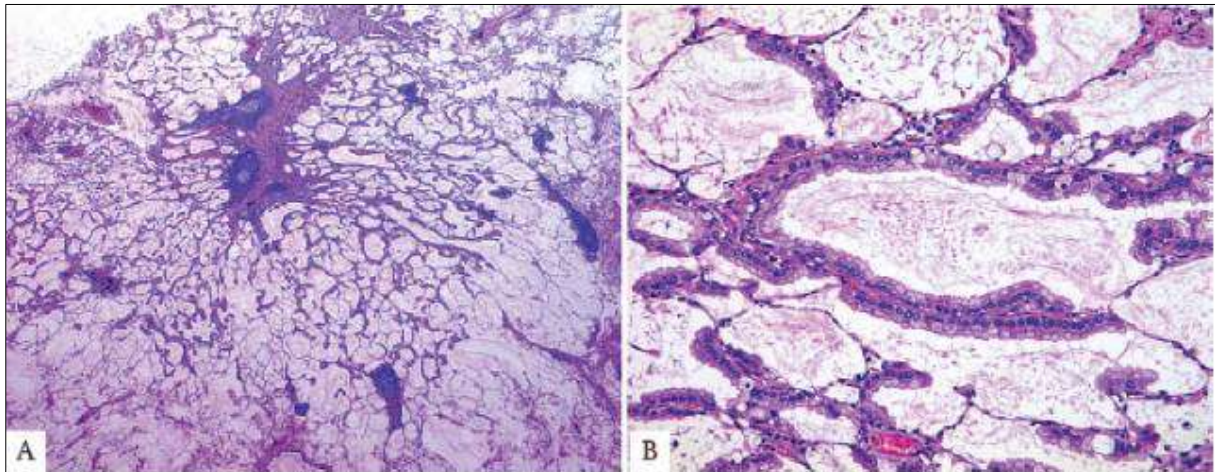


Figure 9: adénocarcinome in situ mucineux (HES A : x 12,5 ; B : x 200)

3. L'adénocarcinome avec invasion minime :

Il s'agit d'un adénocarcinome unique de petite taille, $\leq 3\text{cm}$, avec une architecture à prédominance lépидique et avec une zone d'infiltration ne dépassant pas 5mm dans sa plus grande dimension et en un seul foyer. Cette lésion est habituellement de type non mucineux mais peut être dans de rares cas, mucineux. La composante invasive est définie comme la dissémination de cellules tumorales au sein d'un foyer de stroma-réaction tumorale fibrosante et inflammatoire. Au niveau de cette composante, l'architecture peut être de type acineux, papillaire et/ou solide. Le diagnostic est exclu si la tumeur présente des invasions vasculaires, lymphatiques ou pleurales ou des zones de nécrose tumorale. S'il existe plusieurs foyers de

micro-invasion, c'est la plus grande dimension du plus grand foyer qui doit être prise en compte.

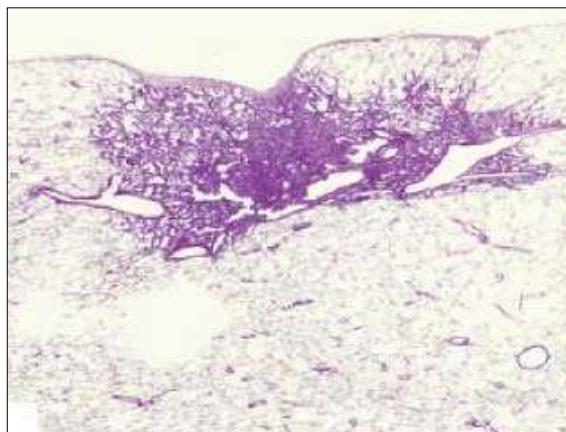


Figure 10: adénocarcinome avec invasion minimale (HES x 12,5)

4. L'adénocarcinome infiltrant à prédominance lépidique :

Il s'agit d'un adénocarcinome composé de cellules tumorales dérivées des pneumocytes de type II ou des cellules de Clara, s'étendant le long des parois alvéolaires. La composante infiltrante correspond à un foyer de plus de 5mm dans sa plus grande dimension. Des aspects d'invasions vasculaires, lymphatiques et pleurales ainsi que la nécrose tumorale sont possibles. Ce sous-type d'adénocarcinome est par définition non-mucineux mais il peut exister une architecture lépidique dans un adénocarcinome mucineux.

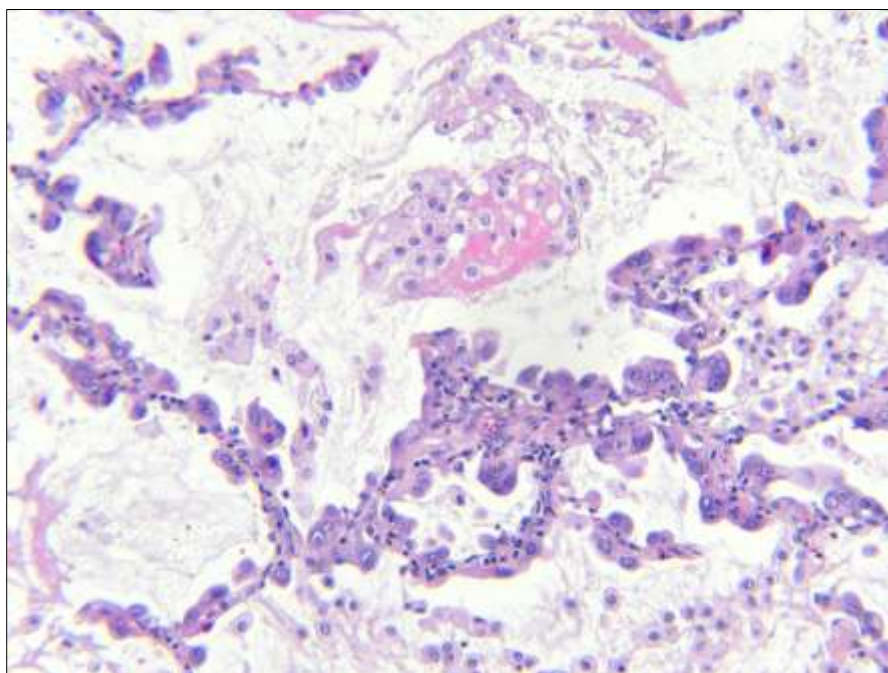


Figure 11 : adénocarcinome lépidique (HES x 200)

5. L'adénocarcinome infiltrant à prédominance acineuse :

La tumeur se compose majoritairement de glandes rondes à ovales, dont la lumière est bordée par des cellules tumorales. Les cellules ainsi que les lumières glandulaires peuvent contenir de la mucine colorée par le PAS. L'architecture peut parfois être cribriforme.

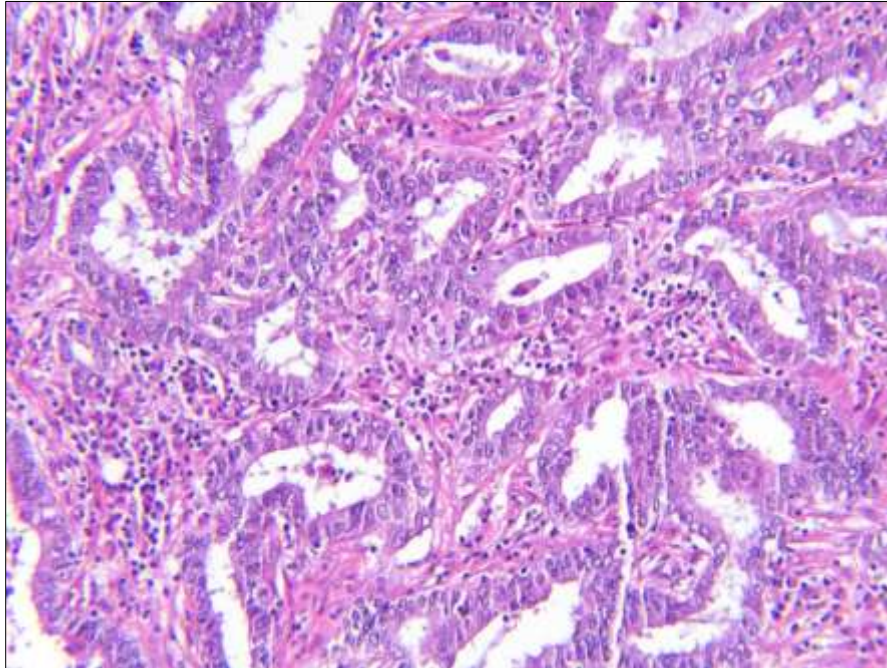


Figure 12 : adénocarcinome acineux (HES x 200)

6. L'adénocarcinome infiltrant à prédominance papillaire :

Il s'agit d'une prolifération de cellules glandulaires tumorales le long des axes fibro-vasculaires centraux. Le stroma fibroblastique n'est pas indispensable pour confirmer ce diagnostic.

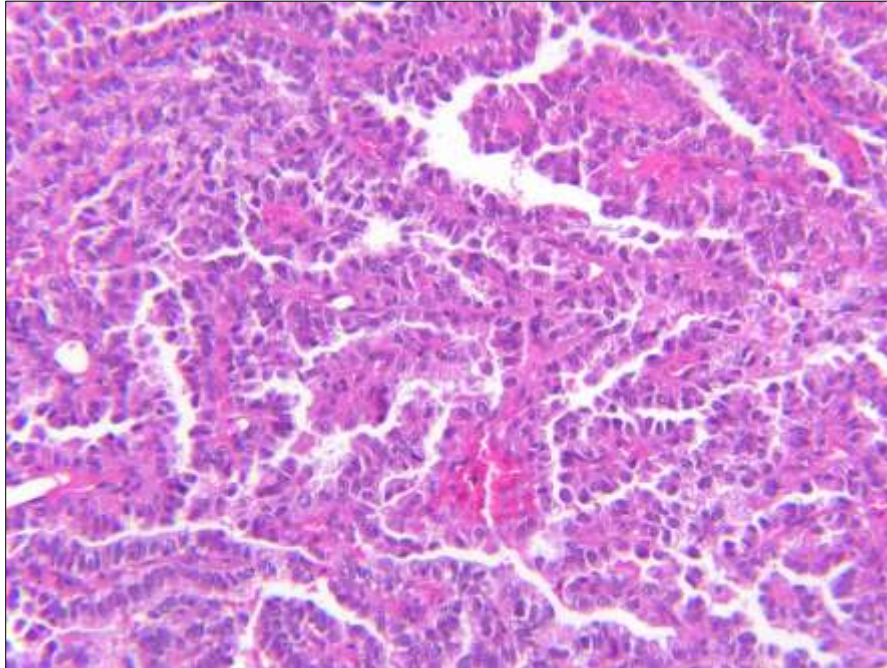


Figure 13 : adénocarcinome papillaire (HES x 200)

7. L'adénocarcinome infiltrant à prédominance micropapillaire :

Les cellules tumorales prolifèrent sous forme de touffes papillaires sans la présence d'axes fibro-vasculaires. Ces amas sont connectés aux parois alvéolaires ou détachés dans les lumières. Les cellules sont généralement petites et cubiques avec des atypies minimales. Les invasions vasculaires sont fréquentes et les psammomes sont courants.

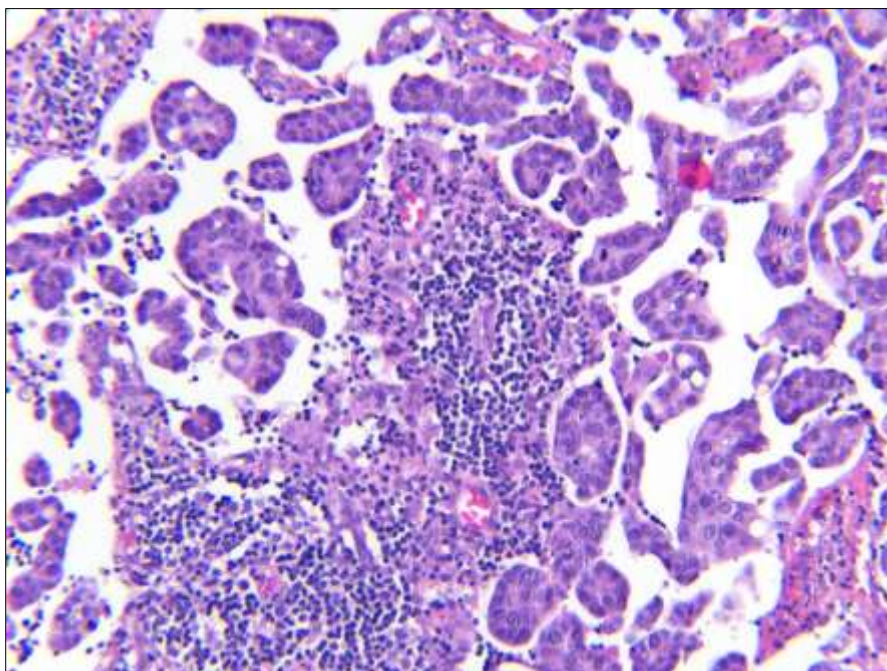


Figure 14 : adénocarcinome micropapillaire (HES x 200)

8. L'adénocarcinome infiltrant à prédominance solide avec production de mucine:

La tumeur s'agence en nappes de cellules tumorales de forme polygonale, sans architecture de type acineux, papillaire, micropapillaire ou lépidique discernable. Si la tumeur est 100% solide, la mucine intracellulaire doit être identifiée au sein d'un nombre seuil de cellules.

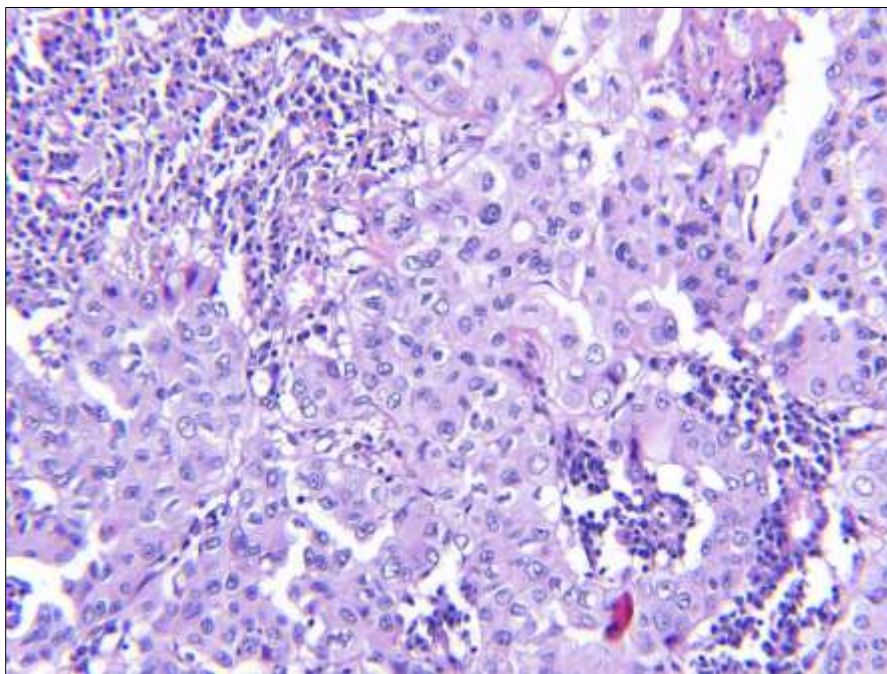


Figure 15 : adénocarcinome solide avec production de mucine (HES x 200)

9. L'adénocarcinome infiltrant mucineux: [12]

Les cellules tumorales sont de forme cylindrique ou caliciformes à mucus avec un cytoplasme fortement mucineux. Les atypies cyto-nucléaires sont minimales. Les espaces alvéolaires contiennent souvent de la mucine. L'architecture peut être de type acineux, papillaire, micro papillaire, solide ou lépidique. Ce type de tumeur est souvent multicentrique, multilobaire et bilatéral ce qui reflète le mécanisme aérifère de sa diffusion.

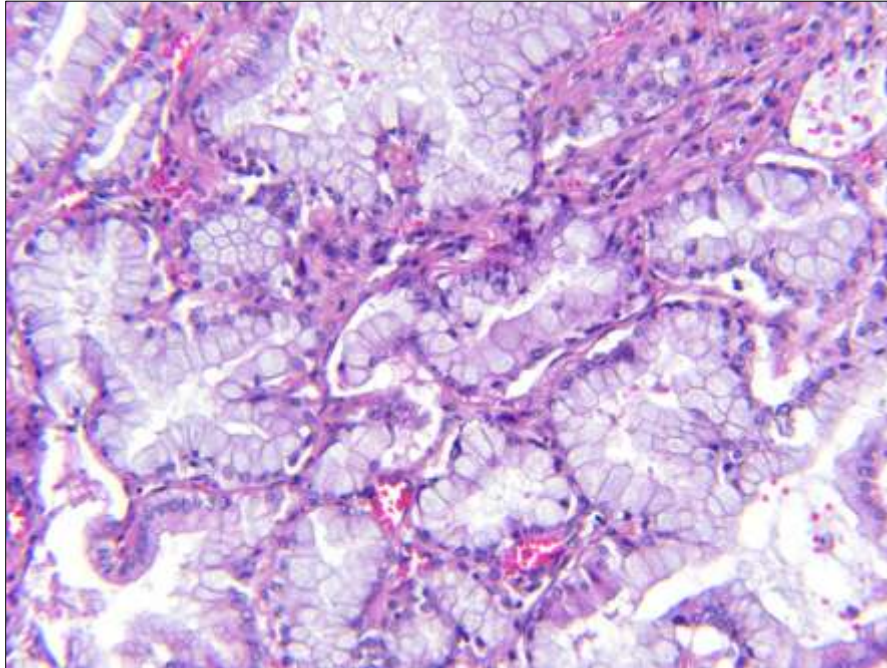


Figure 16 : adénocarcinome mucineux (HES x 200)

10. L'adénocarcinome infiltrant colloïde : [12]

La tumeur présente d'abondantes flaques de mucine extra-cellulaire, qui distendent les espaces alvéolaires sans détruire les parois. Les flaques contiennent parfois des amas de cellules tumorales mucosécrétantes qui peuvent être représentées en faible quantité. Le type colloïde est plus souvent retrouvé dans un type mixte s'associant à d'autres sous-types, dans ce cas, les composantes doivent être évaluées de façon quantitative. Les formes antérieurement rapportées comme cystadénocarcinomes mucineux, rares dans le poumon, sont maintenant intégrées, comme une forme kystique de ce type histologique.

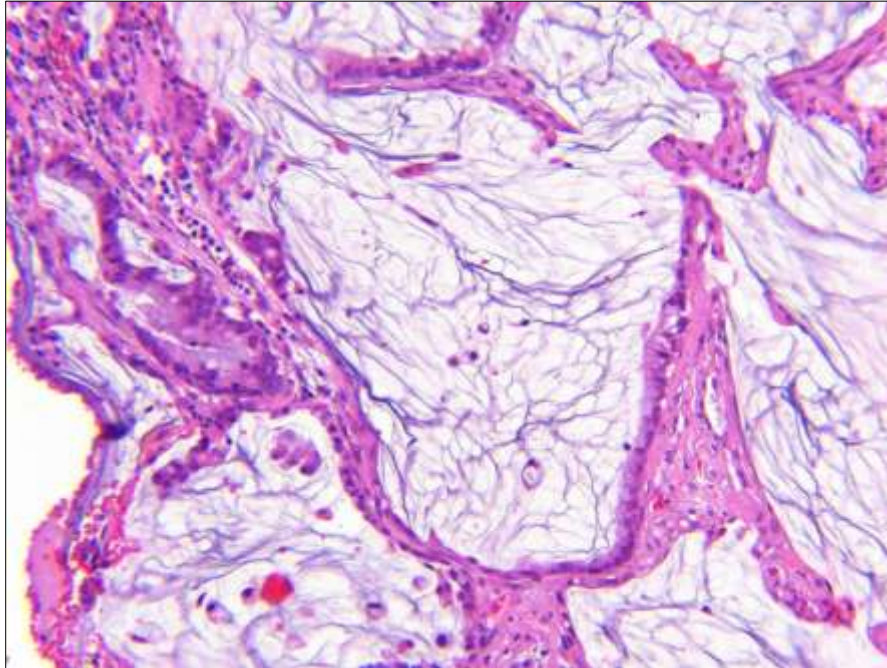


Figure 17 : adénocarcinome colloïde (HES x 200)

11. L'adénocarcinome infiltrant fœtal : [12]

Il consiste en des structures glandulaires d'architecture tubulaire, composées de cellules tumorales non ciliées riches en glycogène, qui rappellent les tubules pulmonaires fœtaux. Les vacuoles paranucléaires sont fréquentes et les morules malpighiennes sont courantes. La plupart des tumeurs sont de bas grade et de bon pronostic. La genèse de ces tumeurs intègre des mutations de la voie β caténine.

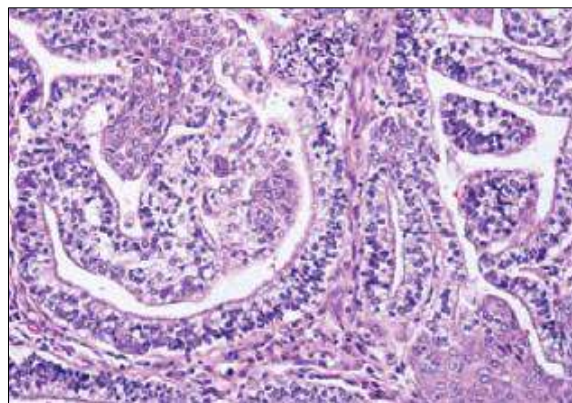


Figure 18 : adénocarcinome fœtal (HES x 100)

12. L'adénocarcinome infiltrant entérique : [12]

Ce sous-type partage les caractéristiques morphologiques et immunohistochimiques du carcinome colorectal. Mais il s'associe fréquemment à d'autres types d'architecture comme le

type lésionnel. Il s'agence en structures papillaires ou glandulaires, parfois cribriformes, limitées par des cellules tumorales cylindriques avec pseudo-stratification nucléaire et nécrose luminale. Les tumeurs peu différenciées s'agencent de façon solide.

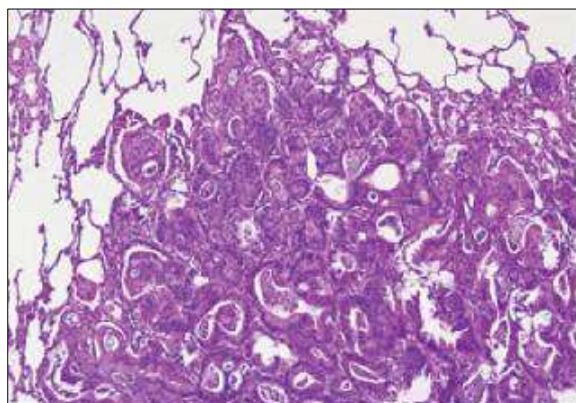


Figure 19 : adénocarcinome entérique (HES x 100)

X. Caractéristiques immunohistochimiques :

L'expression des différents marqueurs varie en fonction du sous-type et de la différenciation de la tumeur. L'expression des marqueurs épithéliaux comme la pancytokératine AE1/AE3 (CK AE1/AE3), l'antigène « epithelial membrane antigen » (EMA) et l'antigène « carcinoembryonic antigen » (ACE) est typique [12]. La cytokératine 7 (CK 7) est exprimée dans quasiment 100 % des cas contrairement à la cytokératine 20 (CK 20) qui l'est rarement.

L'antigène Thyroïde Transcription Factor (TTF1) est généralement exprimé, dans environ 75 % des cas, surtout dans les tumeurs bien différenciées.

Les adénocarcinomes mucineux présentent un profil immunohistochimique aberrant par rapport aux autres sous-types histologiques, mais conforme à la majorité des carcinomes à différenciation intestinale extra-pulmonaire, exprimant TTF1 dans moins de 30 % des cas, CDX2 et MUC2 dans moins de 20 % des cas, CK7 dans 100 % et CK20 de 30 à 60 % des cas [13].

En pratique devant un CBNPC, il sera étudié l'expression de TTF1, spécifique des adénocarcinomes (95 %) et celle de la p40 fortement spécifique des carcinomes épidermoïdes (98 %) [14].

XI. Stadification (TNM UICC 2009):

Les cliniciens et pathologistes ont adopté la nouvelle stadification proposée par l'IASLC et présente également dans la 7^e édition de la classification TNM UICC datant de 2009 [15].

Les critères pour le T, le N et le M se sont basés uniquement sur des facteurs pronostiques. Cette stadification est donc responsable des différentes conduites à tenir thérapeutiques.

| Descriptor | Definition |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Primary tumor (T) | |
| Tx | Tumor that cannot be assessed or is not detected radiologically or bronchoscopically but is proven histopathologically (malignant cells in bronchopulmonary secretions) |
| T0 | No evidence of primary tumor |
| Tis | Carcinoma in situ |
| T1 | Tumor with the following characteristics: Size \leq 3 cm Airway location: in lobar bronchus or more distal airways Local invasion: none, surrounded by lung or visceral pleura Subdivisions: T1a (size \leq 2 cm) and T1b (2 cm < size \leq 3 cm) |
| T2 | Tumor with size > 3 cm but \leq 7 cm or tumor with any of the following characteristics: Airway location: involvement of the main bronchus (distance to the carina is \geq 2 cm) or presence of atelectasis or obstructive pneumonitis that extends to hilar region but does not involve the entire lung Local invasion: involvement of visceral pleura Subdivisions: T2a (3 cm < size \leq 5 cm) and T2b (5 cm < size \leq 7 cm) |
| T3 | Tumor > 7 cm in size or tumor with any of the following: Airway location: tumor in the main bronchus (within 2 cm of the carina), or tumor with atelectasis or obstructive pneumonitis of the entire lung Local invasion: direct invasion of chest wall (including superior sulcus tumors), diaphragm, phrenic nerve, mediastinal pleura, or parietal pericardium Satellite tumor nodule(s) in the same lobe as the primary tumor |
| T4 | Tumor of any size invading any of the following: mediastinum, heart, great vessels, trachea, recurrent laryngeal nerve, esophagus, vertebral body, or carina; or tumor with satellite tumor nodule(s) in a different lobe, ipsilateral to that of the primary tumor |
| Lymph nodes (N) | |
| Nx | Regional lymph nodes cannot be assessed |
| N0 | Absence of regional lymph node involvement |
| N1 | Presence of metastasis to ipsilateral peribronchial and/or ipsilateral hilar lymph nodes (including direct extension to intrapulmonary nodes) |
| N2 | Presence of metastasis to ipsilateral mediastinal and/or subcarinal lymph nodes |
| N3 | Presence of metastasis to any of the following lymph node groups: contralateral mediastinal, contralateral hilar, ipsilateral or contralateral scalene, or supraclavicular nodes |
| Distant metastasis (M) | |
| M0 | Absence of distant metastasis |
| M1 | Presence of distant metastasis Subdivisions: M1a (satellite tumor nodule(s) in a contralateral lobe to that of the primary tumor or tumors with malignant pleural or pericardial effusion) M1b (distant metastasis) |
| The uncommon superficial spreading tumor of any size with its invasive component limited to the bronchial wall is classified as T1a even in the case of extension to main bronchus. | |

Tableau 2 : 7^e édition TNM UICC 2009[15]

| | |
|------------------|----------------------------------|
| Occult carcinoma | (TxN0M0) |
| Stage 0 | (TisN0M0) |
| Stage IA | (T1a/bN0M0) |
| Stage IB | (T2aN0M0) |
| Stage IIA | (T1a/bN1M0, T2aN1M0, T2bN0M0) |
| Stage IIB | (T2bN1M0, T3N0M0) |
| Stage IIIA | (T(1-3)N2M0, T3N1M0, T4N(0-1)M0) |
| Stage IIIB | (T4N2M0, T(1-4)N3M0) |
| Stage IV | (Any T, any N, M1) |

Tableau 3 : stades cliniques en fonction du TNM [15]

XII. Traitement :

La conduite thérapeutique est fonction du type histologique de la tumeur, de son extension loco-régionale et à distance mais aussi des antécédents, de l'état général et de l'opérabilité du patient.

1. CBNPC résécables et opérables :

Il s'agit de cancers localisés correspondant aux stades I et II (certains stades IIIA chez des patients opérables), et représentant 20% des cancers [15].

La chirurgie reste la meilleure option thérapeutique. La résection carcinologiquement recommandée consiste au minimum en une lobectomie et parfois en une pneumonectomie, en respectant les limites anatomiques et en un curage ganglionnaire médiastinal complet et systématique (au moins 6 à 8 ganglions retirés et 3 chaînes ganglionnaires explorées). La résection est carcinologiquement satisfaisante quand les recoups sont en zone saine. La mortalité péri-opératoire est très faible en cas de lobectomie (< 1%) et non négligeable en cas de pneumonectomie (moins de 4% à gauche mais jusqu'à 10% à droite).

En ce qui concerne les traitements complémentaires, la chimiothérapie post-opératoire est le standard dans les stades II et IIIA mais n'est pas indiquée dans les stades I, sauf dans les stades IB de plus de 4 cm, où elle est optionnelle. Elle consiste en 4 cures comprenant un sel de platine avec au mieux une association cisplatine-vinorelbine (protocole le mieux validé) ou carboplatine-paclitaxel en cas de contre-indication au cisplatine. Elle améliore de 5 à 10% la survie à 5ans [16].

La radiothérapie post-opératoire est proposée en cas d'atteinte pariétale étendue, en cas de lésion classée N2 (preuve histologique nécessaire), en cas d'envahissement de la plèvre pariétale sur la pièce opératoire ou en cas de recoupe bronchique ou vasculaire en zone tumorale. Elle délivre 50 à 54 Gy sur les sites ganglionnaires envahis et 60 à 66 Gy sur les recoups envahies (R1 ou R2) [16].

Pour les stades II et IIIA dont la résécabilité est jugée limite en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) avec le chirurgien et le radiologue, une alternative consiste à proposer une chimiothérapie néo-adjuvante sous forme de 2 à 3 cures, puis une réévaluation suivie éventuellement par une chirurgie d'exérèse en fonction de la réponse tumorale à la chimiothérapie [1].

2. CBPNC non résecables ou patients inopérables :

Ces cas représentent environ 35% des cas et correspondent aux stades localement avancés non résecables (IIIA ou IIIB). Il est proposé une association radiothérapie/chimiothérapie, idéalement menée de manière concomitante et en cas d'impossibilité de manière séquentielle [1].

Le protocole à base de cisplatine et étoposide est le plus robustement validé. Les protocoles cisplatine/vinorelbine et carboplatine/taxol, sont des alternatives à ce protocole de référence. Leur efficacité est moins bien établie.

La gemcitabine et le docetaxel ne doivent pas être utilisés en dehors d'essais thérapeutiques. La radiothérapie délivre 66 à 70 Gy. Le volume-cible comporte la tumeur et les ganglions de plus de 1cm, adapté en fonction de la morpho-TEP initiale. Les marges sont adaptées à l'histologie, la topographie tumorale et la précision de la technique utilisée [16].

3. CBNPC métastatiques :

Ils correspondent aux stades IV et représentent 45% des cas. La conduite est dépendante du statut mutationnel du gène de l'EGFR [1].

Les patients non mutés (ou recherche de mutation impossible) peuvent bénéficier d'une chimiothérapie avec un doublet à base de sel de platine. En cas de mutation du gène de l'EGFR, un inhibiteur de la tyrosine kinase (ITK) est indiqué en première ligne thérapeutique (gefitinib ou erlotinib).

Pour les CBNPC, non épidermoïdes, un médicament antiangiogénique comme le bevacizumab peut être proposé dans certaines conditions (nombreuses contre-indications et précautions d'emploi). Le taux de réponse en 1^{ère} ligne est de 30% seulement et la médiane de survie des patients traités par chimiothérapie est de 12 mois.

XIII. Plan CANCER de l'INCa :

Dans le cadre du plan cancer 2009-2013, la mesure 21 consiste à garantir un égal accès aux traitements et aux innovations.

L'action 21.2 consiste plus précisément, à développer les plateformes de génétique moléculaire des cancers et l'accès aux tests moléculaires [17].

Les 28 plateformes de génétique moléculaire assurent la recherche des mutations activatrices de l'EGFR pour tous les patients, quel que soit l'établissement dans lequel ils sont pris en charge. L'INCa a alloué un budget exceptionnel de 1,7 million d'euros en 2009 afin

qu'elles effectuent ce test gratuitement et dédommagent les pathologistes qui transmettent les prélèvements. Des financements reconductibles sont prévus en 2011 dans le cadre du Plan cancer. Les plateformes de génétique moléculaire permettent ainsi un accès optimal aux inhibiteurs de la tyrosine kinase : pour prescrire un traitement aux seuls patients susceptibles d'en bénéficier, pour ne pas prescrire un traitement inutile, toxique et coûteux [18].

XIV. Epithelial Growth Factor Receptor (EGFR):

1. Le gène de l'EGFR:

Le gène est situé au niveau du bras court du chromosome 7 (7p12-13), constitué de 28 exons (200kb) [19] et code pour une protéine, une tyrosine kinase de 170kDa [20]. Cette protéine est présente dans les conditions physiologiques, dans les cellules d'origine méso- et ectodermiques à un taux de 2×10^4 à 2×10^5 récepteurs par cellule. Elle est impliquée dans les voies de signalisation de l'apoptose, de la prolifération et de la différenciation cellulaires. Au niveau de l'appareil respiratoire, l'expression de l'EGFR est forte dans les cellules épithéliales bronchiques et modérée dans les cellules épithéliales alvéolaires. Elle est également surexprimée dans de nombreuses tumeurs solides comme les tumeurs gliales, les carcinomes mammaires, les carcinomes coliques et les carcinomes bronchiques non à petites cellules [21].

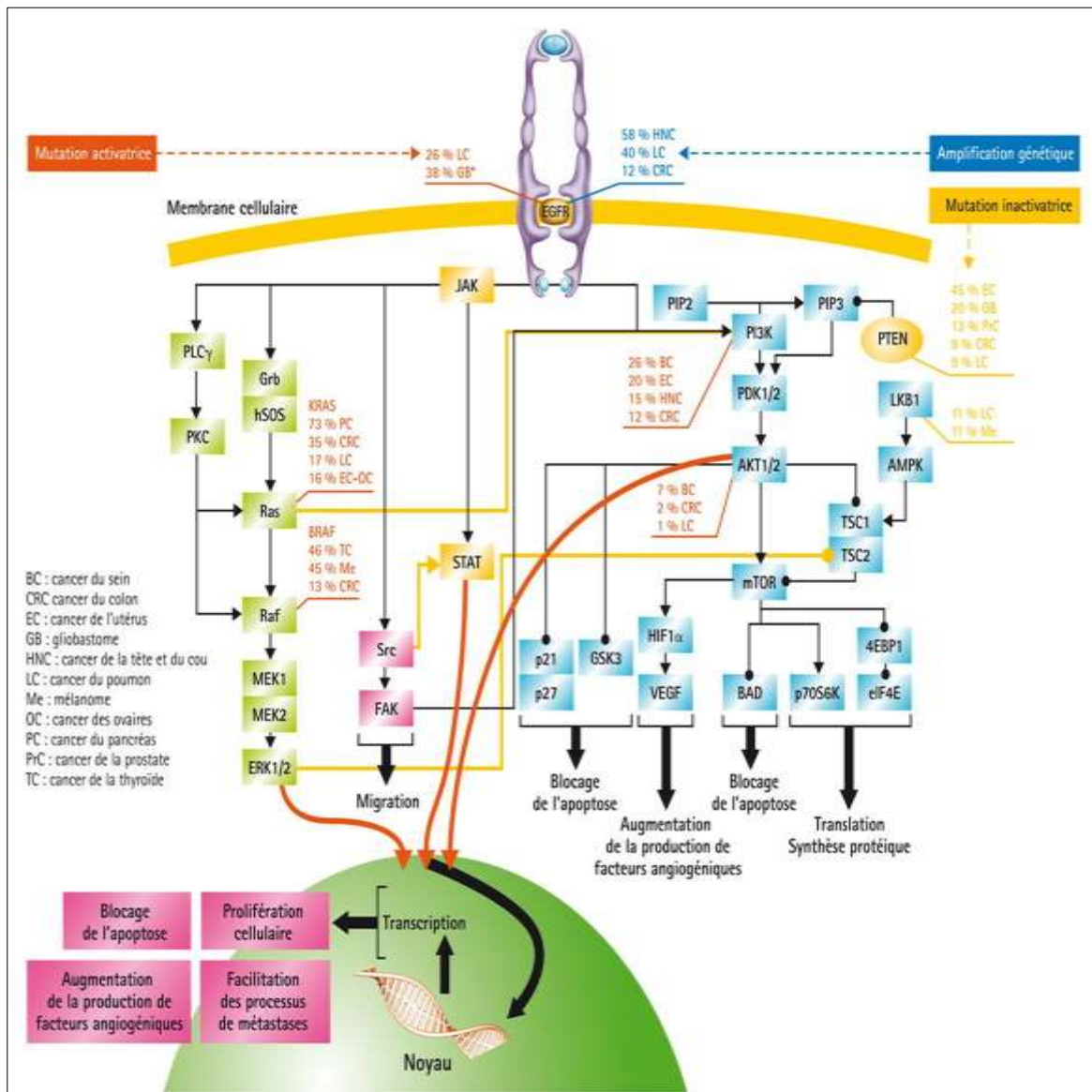


Figure 20: la voie de signalisation et ses différentes atteintes selon les pathologies

2. La famille des protéines erbB :

L'EGFR s'intègre à la famille des facteurs de croissance épidermiques erbB/HER comprenant erbB1=Her1 nommé communément EGFR, erbB2/Her2/neu, erbB3/Her3 et erbB4/Her4 [22].

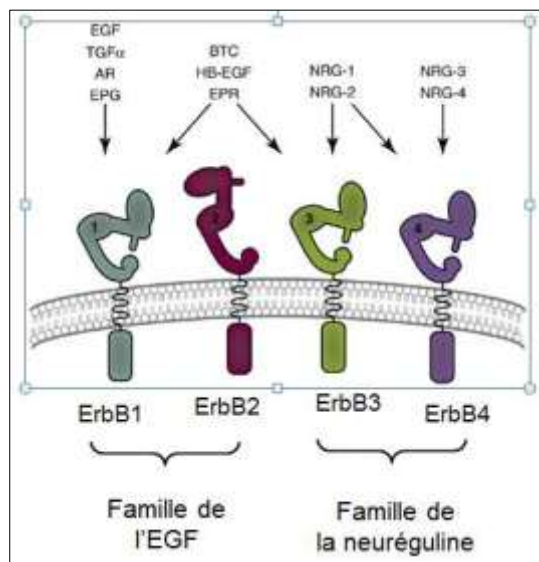


Figure 21: la famille des protéines erbB

Chaque protéine comporte 4 domaines fonctionnels :

- un domaine extracellulaire NH₂-terminal site de liaison au ligand extramembranaire,
- un domaine transmembranaire, hydrophobe, qui permet au récepteur de rester ancré à la membrane plasmique,
- un domaine intracellulaire COOH-terminal, présentant une activité enzymatique tyrosine kinase, avec un petit lobe contenant le site de liaison de l'ATP et un grand lobe contenant le site catalytique de l'enzyme,
- un domaine de régulation C-terminal qui comporte plusieurs résidus tyrosine se phosphorylant de manière spécifique après liaison du ligand.

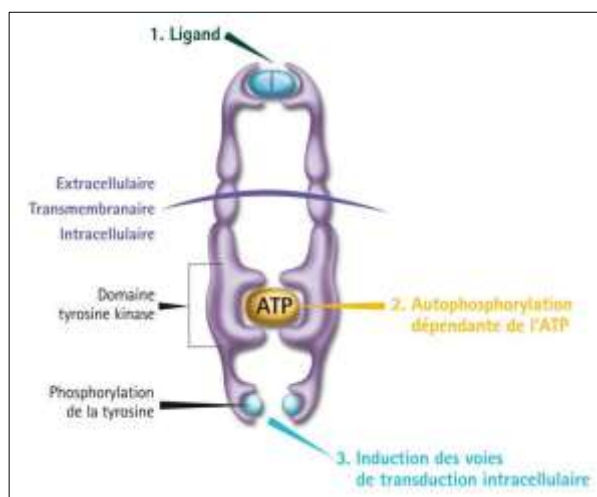


Figure 22 : le récepteur à l'EGF et ses différents domaines

3. La voie de signalisation :

Il existe différents types de ligands, comme l'EGF intégrant une grande famille de récepteurs de facteurs de croissance avec le TGF- α (Transforming Growth Factor Receptor- α), l'amphiréguline, l' α -celluline, l'épiréguline et l'héparine-binding EGF.

La liaison d'un ligand spécifique ou moins spécifique au domaine extramembranaire des erbB conduit à la formation d'homodimères ou d'hétérodimères d'EGFR, la forme monomère étant inactive [23]. HER2 est l'hétérodimère privilégié de l'EGFR [24]. Le rapprochement des deux domaines tyrosine-kinases aboutit à l'activation de la fonction tyrosine kinase et permet l'auto- ou la transphosphorylation des différents résidus tyrosine situés à l'extrémité COOH-terminale intracellulaire du récepteur [25]. Les résidus phosphorylés servent alors de points d'ancrage à des protéines adaptatrices, elles-mêmes points de liaison de protéines de signal qui déclenchent plusieurs voies de signalisation. Après activation du récepteur, la transduction du signal implique essentiellement trois types de molécules : les protéines à domaines SH2/SH3, les protéines G monomériques et les protéines kinases avant d'emprunter différentes voies de signalisation.

Ces différentes voies de signalisation concourent à la prolifération cellulaire, la migration cellulaire et favorisent la survie des cellules.

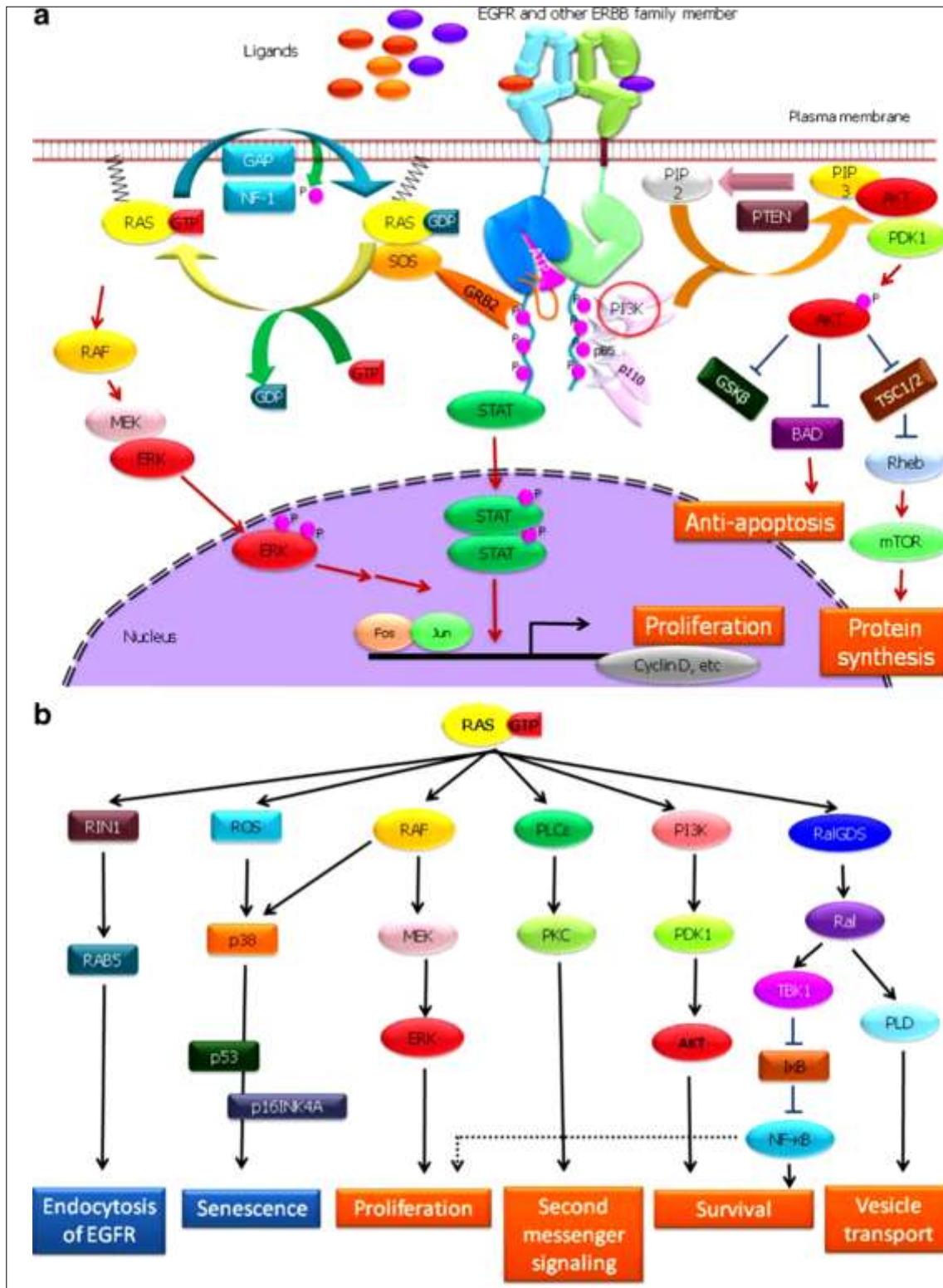


Figure 23 : voies de signalisation d'EGFR (a) et de KRAS (b) [26]

a) Les protéines à domaine src homology region 2 et 3 :

Les protéines à domaine src homology region 2 et 3 (SH2/SH3) sont le premier relais de l'action des récepteurs à tyrosine kinase. Ces domaines ont été initialement identifiés dans la protéine p60src. Comme ils ont été retrouvés par la suite dans d'autres protéines, avec une bonne conservation, ils ont été appelés SH2/SH3 pour src homology region 2 et 3. Les

domaines SH2 comportent deux sites : un premier site qui reconnaît spécifiquement une tyrosine kinase, uniquement lorsqu'elle est phosphorylée, un deuxième site qui reconnaît un résidu tyrosine phosphorylée [27].

b) La voie Growth Factor Receptor Bound-son of sevenless-Ras :

La protéine cytoplasmique Grb2 (Growth Factor Receptor Bound) possède un domaine SH2 situé entre deux domaines SH3. Les domaines SH3 permettent la liaison de Grb2 à la protéine Sos (Son of sevenless). Lorsque l'EGFR s'autophosphoryle, la tyrosine phosphorylée est reconnue par le domaine SH2 de Grb2, d'où l'interaction EGFR/Grb2/Sos. La protéine se trouve positionnée à proximité du substrat, la protéine p21 codée par Ras. La protéine Sos est un facteur d'échange qui agit sur Ras-GDP pour faciliter le remplacement du GDP par le GTP [27].

c) La protéine Ras ou p21^{Ras} :

La protéine Ras (ou p21Ras) a la propriété de lier le GTP, puis dans un second temps d'hydrolyser ce GTP en GDP. Un signal cellulaire est transmis à l'intérieur de la cellule durant le temps où ras est lié au GTP [27].

d) La cascade des Mitogen Activated Protein kinases (MAP kinases):

La protéine Ras, activée par sa liaison à GTP grâce à Sos, agit sur la kinase raf-1 en provoquant un changement de localisation de cette kinase. La kinase raf-1 activée induit une phosphorylation en cascade de deux autres MAP-kinases (Mitogen Activated Protein), MEK (MAP-Extracellular signal Regulated Kinase) puis ERK (Extracellular signal Regulated Kinase). Cette dernière, après activation, est transloquée dans le noyau et phosphoryle à son tour différents facteurs de transcription comme fos, jun ou myc. Cette voie de signalisation permet de contrôler l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la migration cellulaire, l'invasion tissulaire et l'angiogenèse [28, 29].

e) La voie de la phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K):

Les membranes lipidiques contiennent des phospholipides, dont certains sont des phosphoinositides. Le phosphoinositol peut être clivé par les phospholipases C et exercer un rôle de médiateur intracellulaire. Dans certains cas, les carbones du cycle inositol vont subir

une phosphorylation spécifique, par la phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K). Cette molécule sert de point d'ancrage à de nombreuses protéines et permet d'initier des voies de signalisation. La protéine kinase B (PKB ou Akt) est une sérine/thréonine kinase qui va être activée par PI3K et qui va phosphoryler de nombreux substrats cytosoliques, dont mTOR intervenant dans la régulation du cycle, de la croissance et dans la prolifération cellulaire ou une caspase Ikb intervenant dans l'apoptose. Cette voie de signalisation aboutit donc à l'inhibition de l'apoptose et à la prolifération cellulaire [30].

f) La voie Janus kinase—Signal Transducer and Activator of Transcription :

Une autre voie de signalisation intracellulaire peut être mise en jeu par EGFR. Jak (Janus kinase) s'autophosphoryle sur les tyrosines de l'EGFR qui vont recruter des protéines cytosoliques spécifiques à domaine SH2, qui sont appelées STAT. Les STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) sont à la fois des médiateurs de signaux membranaires et des facteurs de transcription. Cette voie de signalisation est essentiellement impliquée dans l'inhibition de l'apoptose [27].

4. La modulation de l'activité de l'Epidermal Growth Factor Receptor :

La modulation de l'activité de l'EGFR peut schématiquement se faire à différents niveaux et de manière non exclusive :

- sécrétion par la cellule de son propre ligand, EGF ou TGF- α , aboutissant à une activation autocrine du récepteur,
- surexpression de l'EGFR par régulation transcriptionnelle [31]. Par exemple, la transcription du gène de l'EGFR est modulée par un polymorphisme de séquence de l'intron 1 d'EGFR. La variation du nombre de dinucléotides CA (entre 14 et 21 CA) dans cet intron aboutit à des niveaux d'expression d'ARNm différents [32]. In vitro, la transcription diminue en cas d'augmentation du nombre de dinucléotides CA, alors que la diminution de répétition de dinucléotides CA entraîne une augmentation de la transcription d'EGFR. L'effet constaté sur la transcription in vitro se traduit sur l'expression protéique observée in vivo,
- modulation de l'activité d'EGFR en fonction du type d'hétérodimère formé et ainsi des voies de signalisation activées. Un homodimère EGFR-EGFR induit une prolifération faible et active préférentiellement la voie des MAP kinases, impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaires. Les hétérodimères comprenant HER2 ou HER3, comme par exemple EGFR-HER2 et HER2-HER3 induisent une

- prolifération plus élevée. Ces hétérodimères activent préférentiellement les voies Jak/STAT et PI3K/Akt également impliquées dans l'inhibition de l'apoptose,
- surexpression pathologique de l'EGFR par augmentation du nombre de copies du gène sur le même chromosome (amplification) ou par augmentation du nombre de chromosomes 7 (polysomie),
 - apparition de mutations oncogéniques activatrices. L'homologue de l'EGFR a été identifié comme un oncogène viral responsable de la leucémie chez le poulet. La protéine v-Erb induit une activation permanente de l'EGFR sur les érythroblastes aviaires et induit une prolifération tumorale des cellules. Dans plusieurs cancers dont le CBNPC, l'EGFR devient un oncogène par acquisition d'une mutation activatrice. Le récepteur est activé de façon constitutive et cela en l'absence de ligand [33-35]. Des modèles animaux ont été développés permettant l'expression restreinte et conditionnelle d'une mutation activatrice de l'EGFR dans les pneumocytes de type II. Dans le poumon de ces animaux, on observe successivement une hyperplasie adénomateuse atypique, un adénome et finalement un adénocarcinome [36, 37]. L'arrêt de la transcription d'EGFR ou le traitement par ITK entraîne une régression tumorale complète. Ces adénocarcinomes mutés présentent une addiction oncogénique vis-à-vis de l'EGFR.

5. L'amplification du gène de l'EGFR:

Une polysomie équilibrée ou une amplification génique d'EGFR détectée en FISH (hybridation fluorescente in situ) est retrouvée chez 13 et 9 % des patients respectivement [30]. En pratique l'intérêt d'une recherche systématique d'une amplification du gène EGFR est limité puisqu'elle accompagne le plus souvent une mutation activatrice du récepteur, comme l'a montré l'essai IPASS [38]. Ainsi l'augmentation du nombre de copies de gène est un marqueur moins sensible et moins spécifique, et sa recherche ne doit pas être réalisée en pratique courante pour sélectionner les patients à traiter par ITK [39].

6. La surexpression de la protéine EGFR :

La surexpression d'EGFR est retrouvée dans environ 60 % des carcinomes épidermoïdes et 40 % des adénocarcinomes et carcinomes indifférenciés à grandes cellules. En revanche, aucune surexpression d'EGFR n'est notée dans le cancer bronchique à petites cellules.

La valeur pronostique de l'expression de l'EGFR dans le CBNPC n'est pas clairement démontrée [40, 41]. Pour certains auteurs, une forte expression de l'EGFR est un facteur pronostique défavorable en termes de survie globale et de survie sans progression pour beaucoup de tumeurs épithéliales malignes [26]. Elle serait également prédictive de résistance pour la radiothérapie, la chimiothérapie et les traitements hormonaux [42, 43]. Mais son expression ne serait pas corrélée au statut mutationnel EGFR [44].

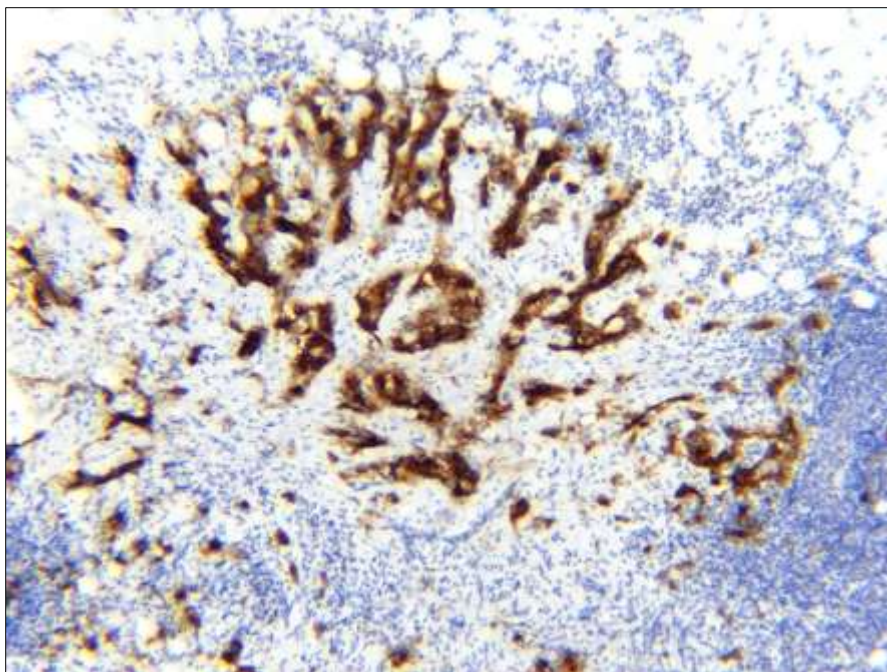


Figure 24: surexpression de la protéine EGFR au sein des cellules tumorales mise en évidence en immunohistochimie

La surexpression de la protéine et l'amplification du gène seraient prédictifs de la réponse aux ITK [21, 45, 46]. En effet dans l'étude de phase III ISEL, un nombre élevé de copies du gène est associé à un risque de décès plus faible avec gefitinib qu'avec placebo (Hazard ratio pour le décès, HR=0,61 ; p=0,067) et les patients avec une surexpression d'EGFR ont une survie globale significativement plus élevée sous gefitinib que ceux sans surexpression (p=0,049) [47]. De la même manière, l'étude de phase III BR.21 a montré que la survie globale est plus élevée avec gefitinib qu'avec placebo chez les patients présentant une expression de l'EGFR (HR=0,68 ; p=0,02) ou un nombre élevé de copies du gène (HR=0,44 ; p=0,008) [48]. Globalement, l'amplification semble être associée au contrôle de la maladie en termes de survie et stabilisation, tout comme la surexpression de l'EGFR mais avec une plus grande hétérogénéité.

Néanmoins une validation prospective et une standardisation des techniques FISH et immunohistochimiques sont des préalables nécessaires avant d'envisager l'utilisation de la

recherche de la surexpression ou de l'amplification génique, comme outil pour orienter le traitement [49]. L'essai récent FLEX suggère l'utilité du dépistage de la surexpression d'EGFR par immunohistochimie, car celle-ci aurait une valeur prédictive positive de réponse au cetuximab en 1^{ère} ligne (anticorps monoclonal ciblant l'EGFR), en association à la chimiothérapie dans les CBNPC [50].

En résumé, la recherche d'une amplification du gène et de la surexpression de la protéine EGFR ne doit pas être retenue dans la sélection des patients à traiter par ITK [51].

7. Les mutations du gène de l'EGFR :

a) Types de mutations :

Les mutations somatiques sont localisées dans les 4 exons du gène de l'EGFR codant pour l'activité tyrosine kinase (codons 18 à 21) [19]. Elles se situent au niveau du site de fixation de l'ATP qui est aussi le site de fixation des ITK.

Elles correspondent à des délétions respectant le cadre de lecture, des insertions ou des mutations ponctuelles faux-sens.

- Exon 19 :

Au sein de l'exon 19, il s'agit de délétions, intéressant toujours la leucine en 747 et la glutamine en 749 et représentant 44 % des mutations de l'EGFR. Il existe plus de 20 variants de délétion de l'exon 19 (9, 12, 15, 18, 24 pb ou délétions-insertions, ...) [28]. Il existe également des insertions représentant 1 % des mutations.

- Exon 21 :

La mutation ponctuelle L858R de l'exon 21 représente 41 % des mutations activatrices de l'EGFR, la mutation ponctuelle L861Q 2 % [52]. La mutation L861R a aussi été recensée dans l'exon 21.

- Exon 18 :

Au sein de l'exon 18, il s'agit de mutations touchant le codon 719 et à l'origine une substitution d'une glycine par une cystéine, alanine ou sérine (G719X) représentant 4 % des mutations [53] ou S720F.

- Exon 20 :

Au sein de l'exon 20, il s'agit d'insertions représentant 3% des mutations, dont la plus fréquente est la substitution T790M [26] [52]. Moins de 1% des mutations concernent les mutations ponctuelles V765A et T783A [53].

La délétion de 15 pb retrouvée dans l'exon 19 du codon 746 au codon 750 (E746-A750) et la mutation ponctuelle L858R de l'exon 21 représentent 90 % des mutations des tumeurs bronchiques [33, 35, 54], [55].

Toutes les mutations ne seraient pas équivalentes du point de vue du pronostic. Les délétions de l'exon 19 seraient associées à une meilleure survie que la mutation ponctuelle L858R de l'exon 21.

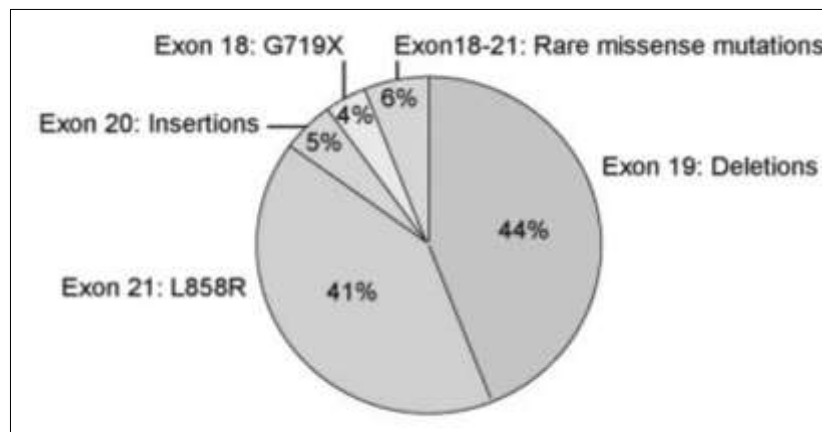


Figure 25: fréquence des différents types de mutations [56]

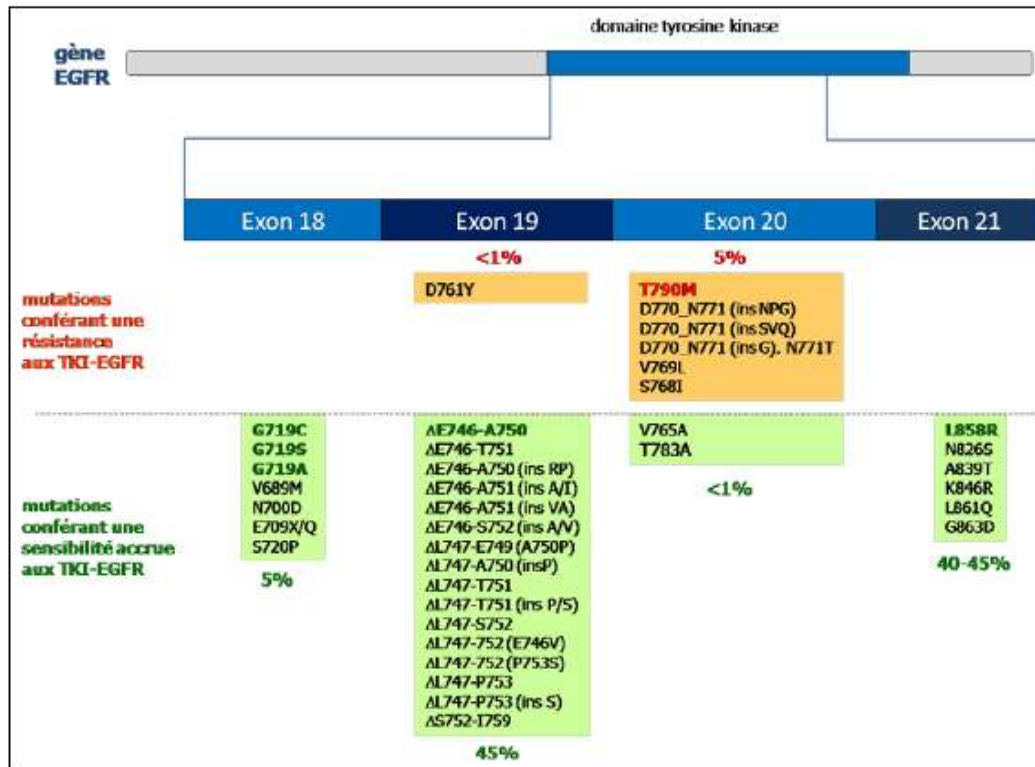


Figure 26: représentation du gène de l'EGFR avec les exons 18 à 21 siège des mutations de sensibilité ou de résistance aux ITK [57]

- Mutation EGFR variant III :

Il s'agit d'une mutation résultant d'une délétion des exons 2 à 7 dans la séquence codante de la discoïdin domain receptor 2 (DDR2), tyrosine kinase activant la migration cellulaire, la prolifération et la survie [58]. Cette mutation a été identifiée dans une série de tumeurs solides, incluant le glioblastome, le cancer du sein, le cancer de l'ovaire, le cancer de la prostate et le cancer du poumon.

Dans ce variant, la liaison à l'EGF ne se fait pas mais la tyrosine kinase intracellulaire est active de façon constitutive, aboutissant à une autophosphorylation de la tyrosine. Il active ensuite la voie de signalisation PIK3CA. Les conséquences cliniques de cette activation ne sont pas encore clairement connues. Mais la mutation EGFRvIII serait corrélée à un nombre augmenté de copies de gène EGFR.

La mutation est rattachée aux carcinomes épidermoïdes, avec une fréquence de 5%, et jamais aux adénocarcinomes. Ces tumeurs porteuses de la mutation EGFRvIII seraient résistantes au gefitinib et à l'erlotinib mais seraient sensibles au neratinib (HKI-272) [59].

b) Profil des patients présentant une mutation :

Ces mutations ont été retrouvées rétrospectivement chez 8 à 30% des patients atteints de CBNPC mais la fréquence varie en fonction des caractéristiques cliniques des populations étudiées.

La fréquence des mutations dépend donc de l'origine ethnique (32 % d'Asiatiques contre 7 % de Caucasiens) [55], du sexe (10 % d'hommes contre 38 % de femmes), du statut tabagique (47 % de non-fumeurs contre 7 % de fumeurs) et du type histologique (30 % d'adénocarcinome contre 2 % d'autres types histologiques) [26], [60].

Les fréquences rapportées des mutations dans les adénocarcinomes pulmonaires est de 22 à 67 % en Asie, 3 à 25 % en Amérique du Nord, et 8 à 24 % en Europe [49], [61], [40].

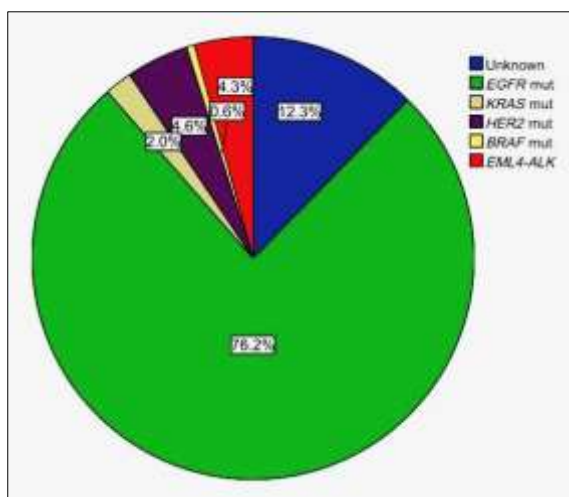


Figure 27: fréquence des mutations chez les femmes non-fumeuses

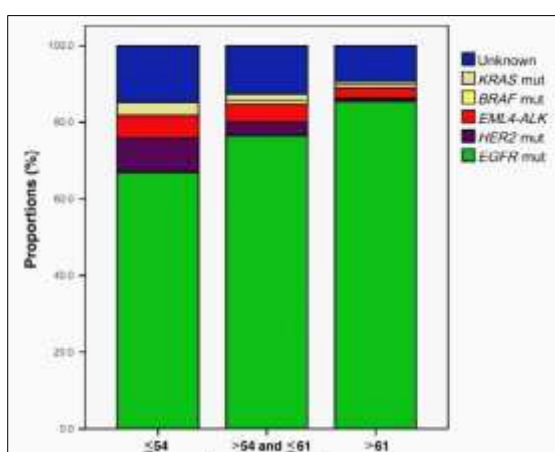


Figure 28: distribution des mutations selon 3 catégories d'âge : le taux de mutations du gène de l'EGFR augmente progressivement avec l'âge, de 66,9 % chez les patients de moins de 54 ans à 85,5 % après 61 ans ($p=0,004$). La fréquence des mutations de HER2 atteint 9,1 % chez les moins de 54 ans et décroît significativement avec l'âge ($p=0,008$).

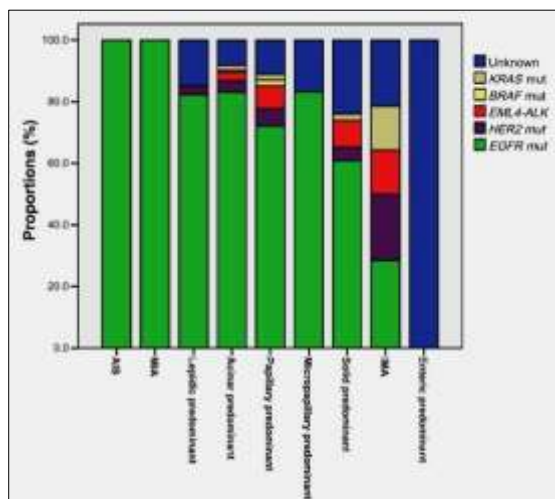


Figure 29: fréquence des mutations en fonction des sous-types histologiques (AIS : adénocarcinome in situ ; MIA : adénocarcinome avec invasion minimale ; IMA : adénocarcinome mucineux infiltrant).

c) Mutations chez les non-fumeurs versus fumeurs :

Plusieurs altérations moléculaires sont connues pour survenir au sein de gènes qui codent pour des voies de signalisation intervenant dans la prolifération cellulaire et la survie. Ces gènes sont définis comme des gènes conducteurs (driver genes). Dans l'adénocarcinome pulmonaire, ces gènes sont EGFR, KRAS, BRAF, PIK3CA et EML4-ALK. Leurs mutations sont responsables de l'initiation et de la progression maligne. Le statut tabagique influence significativement la survenue de ces altérations. Chez les non-fumeurs, les mutations du gène de l'EGFR sont les plus importantes et chez les fumeurs, il s'agit des mutations du gène de KRAS et de BRAF [62]. Différentes voies de signalisation sont donc impliquées dans les mécanismes de la cancérogénèse pulmonaire selon le statut tabagique [48].

d) Conséquences des mutations sur l'activité tyrosine kinase :

Ces mutations confèrent au récepteur la capacité de se transformer et conduisent à son activation constitutive [63]. Le résidu L858 est situé au sein d'une poche hydrophobe de la boucle d'activation de la kinase quand l'EGFR est en état inactif. La substitution de la leucine par une arginine entraîne une déstabilisation de la boucle d'activation et donc de la conformation inactive et favorise la transformation en conformation active [64]. Les délétions de l'exon 19 interviennent dans une chaîne protéique (nommée chaîne β 3), proche de l'hélice C. La réduction de la longueur de la chaîne favoriserait la conformation active de la kinase. Les insertions de l'exon 19, touchant également le résidu leucine 747, altèrent la position de

l'hélice C, favorisant sa conformation active. De manière similaire, les insertions de l'exon 20 survenant au début de l'hélice C, semblent stabiliser la conformation active de la kinase [54]. Ces mutations induiraient, grâce à cette conformation active, une phosphorylation retardée persistante dans le temps et une diminution de l'internalisation de l'EGFR, aboutissant ainsi à l'activation constitutive du récepteur et des voies de signalisation en aval. Selon la théorie de « l'addiction oncogénique » [65], les cellules tumorales mutées deviendraient dépendantes de cette voie pour leur prolifération et leur survie. La mutation induit également une phosphorylation prolongée d'Erk, suivie d'un signal positif pour la prolifération cellulaire. Grâce à la phosphorylation d'Akt, il existe aussi une activation d'une voie de signalisation anti-apoptotique. La mutation agit aussi sur la voie STAT, qui contrôle à la fois la prolifération et l'apoptose [19].

e) Rôle des mutations dans le pronostic :

Elles sont également associées à un meilleur pronostic dans trois essais de phase III ayant comparé un ITK à un placebo [66-68]. Dans le bras placebo, la survie sans progression des malades dont la tumeur était mutée pour l'EGFR était significativement plus longue que celle des tumeurs non mutées.

f) Rôle des mutations activatrices de l'EGFR dans l'efficacité des ITK :

Il est clair aujourd'hui que l'efficacité du traitement par inhibiteurs de la tyrosine kinase est liée au statut mutationnel du gène de l'EGFR [10]. En 2004, le séquençage du gène de l'EGFR d'une série d'adénocarcinomes pulmonaires, a pour la 1^{ère} fois mis en évidence les mutations activatrices et a permis d'identifier les patients porteurs de ces mutations comme de bons répondeurs au traitement par ITK [53] [51]. 70% des tumeurs présentant une de ces mutations répondent au traitement par ITK avec le gefitinib ou l'erlotinib [69]. Le récepteur mutant perd en affinité pour l'ATP au niveau du domaine tyrosine kinase et devient beaucoup plus sensible pour l'erlotinib et le gefitinib [11] [59].

g) Mutations de résistance de l'EGFR :

Il peut s'agir de mutations somatiques ou de mutations acquises au cours du traitement par ITK.

Il est observé qu'une part importante de patients traités par ITK répondant dans un 1^{er} temps, se stabilisent, voire progressent sous ITK après une période approximative de 9 à 13 mois et avec une médiane de survie de 2 ans [70-73].

Certaines insertions de l'exon 20 comme la T790M sont associées à une résistance aux ITK [28] et représentent la moitié des mutations de résistance acquises [53, 55]. Elles agiraient en modifiant l'architecture du site de liaison à l'ATP du récepteur [64]. De plus elles augmentent l'affinité du domaine tyrosine kinase pour l'ATP et réduit ainsi l'action des agents ATP-compétitifs [74].

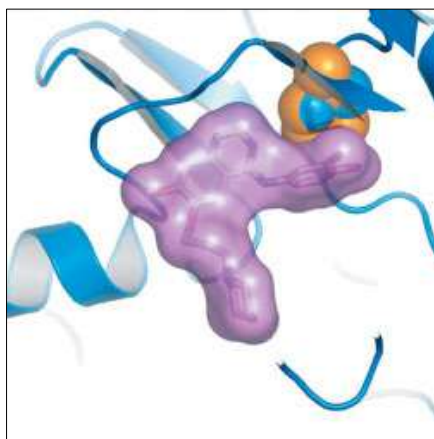


Figure 30: site de liaison entre le gefitinib et l'EGFR siège d'une mutation T790M [73]

La 2^e cause principale de résistance est l'amplification de c-MET et peut s'associer à la mutation T790M [75-78].

Il a également été rapporté les mutations D761Y dans l'exon 19[79], T854A dans l'exon 20[80] et L747S dans l'exon 21 [78]. La mutation D761Y agirait en fragilisant la liaison ITK-EGFR [79].

Après de récentes études, il y aurait un potentiel intérêt à réintroduire un ITK après l'échec d'un précédent traitement par ITK [81, 82]. En effet la tumeur conserverait son addiction oncogénique. L'étude de phase II menée par Oh et al en août 2011 a conclu à un taux de contrôle de la maladie de 65,2% chez des patients déjà traités pendant au moins 3 mois par gefitinib [83]. Ceci pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité moléculaire des cellules tumorales et la persistance après échec de clones tumoraux arborant encore la mutation activatrice et encore dépendants de la voie EGFR.

Une autre hypothèse serait l'existence de cellules souches cancéreuses, intrinsèquement résistantes au gefitinib, et présentes avant tout traitement[84].

h) Technique de détection des mutations de l'EGFR : la biologie moléculaire :

Il s'agit de la méthode de référence (« gold standard ») [28, 85] avec des méthodes de purification d'ADN, PCR et amplification ciblant les exons 18 à 21 et séquençage direct. Elle peut se faire sur matériel fixé et inclus en paraffine ou sur matériel congelé.

Les deux conditions pour une bonne efficacité de la technique sont les modalités de fixation et la quantité absolue de cellules tumorales présentes dans l'échantillon étudié.

- La fixation, paramètre influençant l'efficacité de la technique :

Les modalités de fixation sont la durée de fixation et la nature du fixateur utilisé. Le processus de fixation au formol et inclusion en paraffine est la méthode standard pour la conservation des échantillons biologiques pendant une longue période. Les types de fixateur et le temps de fixation varient en fonction des différents laboratoires. Le taux de pénétration du formol à 10 % (v/v) tamponné pH 7,4 étant approximativement de 1 mm/h, les tissus ne doivent pas être exposés au fixateur trop longtemps, car celui-ci peut altérer les acides nucléiques. Des liaisons entre les protéines et la fragmentation de l'ADN peuvent survenir si la fixation dure trop longtemps, menant à une qualité d'ADN diminuée. De la même manière, une fixation insuffisante conduit à une protéolyse et une dégradation de l'ADN. Une durée minimale de 24 h est requise pour la prise en charge des prélèvements. La PCR est une technique de biologie moléculaire spécifique et sensible, rapide et peu coûteuse. Les fragments d'ADN dans les tissus fixés et inclus en paraffine sont de petite taille (< 300 pb), limitant l'efficacité de la PCR et nécessitant l'ajustement de la technique d'extraction (digestion par la protéinase K) et de la PCR (durée et T° des cycles) [86].

Les échantillons fixés dans l'acétone et le formol 10 % sont les mieux préparés pour une analyse par PCR. Les fixateurs comme le Zamboni, Clarke, paraformaldéhyde, formol-alcool-acétique et méthacarne compromettent sévèrement l'efficacité de la technique. Les fixateurs comme le Carnoy, Zenker ou le Bouin sont également peu recommandés pour ces techniques [87]. De la même manière les échantillons décalcifiés ou fixés dans l'éthanol doivent être évités.

- Autre paramètre : la richesse tumorale :

La richesse tumorale évaluée par le pathologiste lors de l'étape préanalytique est la quantité absolue de cellules tumorales présentes dans l'échantillon. Le problème de la dilution du signal implique d'évaluer cette richesse de manière relative c'est-à-dire en évaluant la

proportion des cellules tumorales parmi les cellules totales incluant aussi les cellules stromales et les cellules normales. La macro- et la microdissection sont la règle pour obtenir un échantillon avec une richesse tumorale adaptée.

Sans amplification, le pourcentage en cellules tumorales doit au moins être de 30% et l'ADN total doit contenir au moins 10% d'ADN muté pour obtenir un résultat.

L'amplification permet donc d'adapter ces techniques aux échantillons de petite taille avec peu de cellules tumorales (5 %), les plus souvent rencontrés dans le cadre diagnostique. La présence d'une nécrose abondante est également un facteur limitant à la recherche des mutations.

Pour obtenir des résultats fiables, il faut une extraction d'ADN de bonne qualité à partir d'un tissu riche en cellules tumorales [85].

Dans la pratique quotidienne, les prélèvements de petite taille comportant au moins 5 % de cellules tumorales ne posent pas de problème de prise en charge. Par contre se pose un problème avec les échantillons de grande taille (souvent des pièces opératoires qui représentent au moins 30 % des prélèvements parvenus au laboratoire pour recherche des mutations) fixés insuffisamment ce qui aboutit à une protéolyse et une dégradation de l'ADN.

Ce type de méthode permet d'avoir des résultats fiables et se prête à l'analyse de grandes séries [19].

Plusieurs techniques spécifiques sont utilisées en fonction de la mutation recherchée et en fonction des habitudes des différentes équipes des plateformes de biologie moléculaire.

Certains laboratoires utilisent la méthode Taqman à la recherche des mutations hot-spot (L858R et E746_A750del), efficace pour des prélèvements de petite taille et pauvres en cellules tumorales, pour lesquels le matériel doit être utilisé à bon escient [88].

Au final cette technique est peu sensible, coûteuse en terme de finance et de moyens techniques et peu rapide [60].

i) L'immunohistochimie :

Cette technique a deux finalités.

La première et la plus importante est de confirmer un diagnostic histologique. C'est une méthode standardisée, fiable et de méthodologie simple. Elle est donc adaptée à la routine du laboratoire d'anatomopathologie. La sensibilité et la spécificité sont de façon globale, bonnes, mais dépendent des anticorps utilisés.

Depuis 10 ans, l'évolution de la morphologie des tumeurs avec des tumeurs de plus en plus indifférenciées, pose le problème récurrent du typage des CBNPC en adénocarcinome ou

carcinome épidermoïde, surtout sur matériel biopsique de petite taille, peu représentatif et gêné par des artefacts liés à la technique de prélèvement. L'immunohistochimie est alors très utile avec 2 anticorps TTF1 et p40 (voir chapitre X).

Dans notre analyse, sa 2^{ème} finalité plus accessoire est la recherche des mutations du gène de l'EGFR.

La délétion de 15pb de l'exon 19 et la mutation ponctuelle L858R de l'exon 21 représentent 90% des mutations du gène de l'EGFR.

Le développement de 2 anticorps qui détectent spécifiquement ces 2 mutations permettrait d'être une 1^{ère} étape dans le screening des mutations avant la technique de référence par biologie moléculaire [60].

L'équipe de Yu et al a mis au point ces 2 anticorps monoclonaux dirigés contre l'EGFR portant la délétion E746_A750 de l'exon 19 ou la mutation ponctuelle L858R de l'exon 21 [89].

L'anticorps monoclonal E746_A750 détecte la délétion de 15pb de l'exon 19 mais également reconnaît certaines des autres rares délétions de l'exon 19 avec une sensibilité variant de 20 à 60% [61].

La recherche des mutations par biologie moléculaire et par immunohistochimie a été comparée dans plusieurs études.

La sensibilité et la spécificité sont assez bonnes même si les résultats sont assez hétérogènes et varient selon les équipes de 23 à 98 % pour la sensibilité et de 38 à 99 % pour la spécificité [61, 85, 89-92].

Cependant cette technique ne permet pas de dépister les autres mutations. Sa sensibilité est donc moindre par rapport aux techniques de biologie moléculaire mais l'immunohistochimie peut présenter certains avantages. En effet, c'est une technique rapide et peu coûteuse. Elle est réalisable dans tous les laboratoires et sur des prélèvements de petite taille et pauvres en cellules tumorales [61]. De plus, l'analyse au microscope optique permet d'associer la morphologie de la cellule tumorale au marquage spécifique [85].

Ceci en fait donc une bonne technique pour un préscreening avant la biologie moléculaire réalisée pour les cas négatifs. Mais l'association des 2 techniques selon un protocole précis n'a pas été évaluée en termes de rentabilité financière et il faudra également déterminer de façon standardisée un cut-off à partir duquel le test sera considéré comme positif.

Plus loin on verra qu'elle pourrait également trouver sa place dans la recherche d'anomalies d'autres biomarqueurs (ex : EML4-ALK).

XV. Les autres biomarqueurs dans le cancer du poumon :

D'autres mutations de gènes intervenant en aval de la voie de signalisation EGFR sont également impliquées dans la cancérogénèse du poumon. En effet n'importe quelle mutation activatrice intervenant dans la voie EGFR/RAS/RAF peut contribuer à la pathogénèse de certains cancers du poumon. Ceci introduit le fait que la présence d'altérations moléculaires supplémentaires, peut diminuer l'efficacité du traitement par ITK sur des tumeurs avec mutations de l'EGFR. Les altérations les plus fréquentes sont les mutations du gène de KRAS, celles du gène de HER2, celles de BRAF, celles de PIK3CA, la fusion du gène ALK mais aussi l'amplification de MET et la surexpression de IGFR1.

1. KRAS :

a) La famille Ras :

Les gènes Ras codent pour une famille de protéines membranaires impliquées dans la régulation de la croissance cellulaire.

Il existe 3 types de gènes Ras, découverts à partir de rétrovirus responsables de sarcomes murins, H-Ras, K-Ras et N-Ras [93].

b) Rôle :

Les gènes Ras codent pour une famille de petites protéines membranaires de 21kDa avec activité GTPasique [26].

Les protéines Ras existent sous deux formes, une forme active avec une molécule de GTP et une forme inactive quand le GTP est hydrolysé en GDP.

Après liaison d'un facteur de croissance au récepteur de surface, des facteurs d'échange de nucléotide guanine sont recrutés au niveau du domaine intracytoplasmique du récepteur membranaire comme Sos1, et vont stimuler la dissociation d'un nucléotide guanine sur Ras. Il en résulte un taux élevé de Ras-GTP.

Quand Ras est sous forme activée, sa fonction GTPasique exerce un rétrocontrôle négatif par l'intermédiaire de protéines activatrices de l'activité GTPasique de Ras, les Ras-GAP, ce qui limite son action sur la croissance cellulaire. Le gène suppresseur de tumeur NF1 code pour une protéine avec activité Ras-GAP [94].

Les altérations du gène Ras consistent en des mutations ponctuelles au niveau des codons 12 et 13 [95], détériorent l'activité GTPasique intrinsèque et confèrent une résistance aux GAP

annulant le rétrocontrôle négatif. Ras s'accumule sous sa forme activée et maintient l'activation de sa voie de signalisation [96].

L'activité de Ras est dépendante de sa fixation à la face interne de la membrane cytoplasmique grâce à des modifications post-translotionnelles appropriées [97]. Après synthèse, un radical hydrophobe est ajouté sur la partie C-terminale de la protéine par une farnésyl-transférase, lui permettant de s'ancrer sur la membrane cytoplasmique.

Ras active Raf en permanence alors qu'en situation physiologique, Raf est activée par Ras après fixation d'un facteur de croissance sur son récepteur membranaire. Ras recrute la protéine Raf au niveau de la membrane, la phosphoryle ce qui déclenche à son tour son activité sérine-thréonine kinase [98]. Raf activée phosphoryle MEK1/MEK2.

ERK1 et ERK2 (MAPKs) sont alors activées et subissent une translocation dans le noyau où elles vont réguler l'activité de plusieurs facteurs de transcription pour l'expression de gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire [28].

La protéine Ras activée agit également sur d'autres voies de signalisation, comme la phosphoinositide 3 kinase qui intervient également dans la cancérogénèse par la voie mTOR. Elle agit également en partenariat avec la p53 aboutissant à l'arrêt de la prolifération cellulaire avec un effet suppresseur de tumeur.

Ces rôles variés dans les voies de signalisation lui confèrent plusieurs applications dans des cancers différents. Dans le cancer colique, l'autorisation de mise sur le marché des anticorps monoclonaux anti-EGFR est restreinte aux patients dont la tumeur n'est pas porteuse de mutations du gène Ras, de phénotype sauvage.

c) Les mutations du gène Ras :

Il s'agit de mutations somatiques fréquentes dans le cancer du poumon, décrites pour la 1^{ère} fois en 1984 [99]. Elles surviennent de façon prédominante dans l'adénocarcinome [100], rarement dans le carcinome épidermoïde et jamais dans le cancer du poumon à petites cellules. Le sous-type histologique contient souvent une composante mucineuse [101]. Les mutations surviennent majoritairement dans le codon 12 avec une transversion G > T [78], occasionnellement dans le codon 13 et rarement dans le codon 61. De rares mutations des gènes HRas et NRas ont été décrites dans le cancer du poumon. Leur incidence est de 30% dans la population caucasienne et de 10% environ dans la population est-asiatique. Le statut K Ras est lié au statut tabagique. En effet une étude japonaise a montré l'augmentation de l'incidence des mutations de KRas en fonction de l'augmentation de l'exposition au tabagisme [102].

Les mutations du gène KRas sont mutuellement exclusives de celles du gène EGFR [103].

d) Valeur pronostique dans le cancer du poumon :

En faisant la synthèse de plusieurs études, il en ressort que le statut de K Ras ne semble pas être lié au pronostic dans les cancers de stade précoce mais pourrait avoir une valeur pronostique négative dans les stades avancés [70, 104, 105].

e) Valeur prédictive de la réponse à une chimiothérapie :

- Stades précoces :

L'étude de Loriot montre que la chimiothérapie adjuvante ne présente un bénéfice que dans le groupe de patients porteur d'un phénotype sauvage [106].

- Stades avancés :

L'étude d'Eberhardt et al a montré que la présence d'une mutation de Ras ne constituait pas un facteur pronostique chez des patients traités par chimiothérapie seule [107].

f) Valeur prédictive de la réponse aux ITK :

La méta-analyse de Linardou et celle de Chen retrouvent un lien entre la présence de la mutation de K-Ras et l'absence de réponse aux ITK de l'EGFR [108-110].

2. HER 2 :

La protéine HER2 ou erbB2 appartient à la famille HER des récepteurs à la tyrosine kinase. Elle forme des homodimères ou des hétérodimères avec d'autres membres de la famille HER [111].

La surexpression de la protéine mise en évidence par immunohistochimie est présente dans environ 20% des adénocarcinomes et l'amplification du gène est mise en évidence par FISH dans environ 2% des cancers du poumon, s'associant pour les deux à un faible pronostic [112].

Les mutations du gène erbB2 codant pour la protéine HER2 sont relativement rares, retrouvées dans environ 3% des adénocarcinomes [52]. La plupart des mutations intéressent des insertions de l'exon 20.

Les mutations touchent la même population cible que celle des mutations EGFR, c'est-à-dire les non-fumeurs et les femmes [113]. Mais la population serait plus jeune [114].

Les tumeurs présentant une mutation de HER2 sont résistantes au traitement par ITK [115]. Le mode d'action de cette résistance se base sur une activité constitutive de la kinase erbb2 qui phosphoryle d'autres protéines de la famille erbB, provoquant ainsi l'activation de la voie de signalisation sous-jacente même si la tyrosine kinase du récepteur de l'EGF est bloquée. Il s'agit de mutations mutuellement exclusives des mutations de l'EGFR et de KRAS. Il a été démontré une efficacité modeste de l'anticorps monoclonal humain anti-her2, le trastuzumab dans les tumeurs porteuses d'une mutation de l'HER2. Des études de phase II sont menées sur l'efficacité de traitements chez des patients présentant une mutation de HER2 avec :

- lapatinib ciblant l'activité tyrosine kinase de l'EGFR et de HER2 [116]
- trastuzumab en association avec le paclitaxel [117] concluant à une bonne efficacité [118].

3. BRAF :

BRAF fait partie de la famille des Raf comportant 3 membres : ARAF, BRAF ET RAF1 (connu aussi sous le nom de CRAF). Il s'agit d'une sérine-thréonine kinase qui relie les kinases Ras aux protéines MAP kinases de la cascade sous-jacente, contrôlant la prolifération cellulaire [111].

Les mutations somatiques sont décrites dans un premier temps dans les mélanomes, avec pour 80% des mutations, une mutation touchant le résidu Valine situé sur le codon 600 de l'exon 15 dans le domaine kinase.

Les mutations du gène BRAF interviennent dans environ 1 à 3 % des adénocarcinomes pulmonaires [52] et touchent essentiellement le résidu leucine en 596 dans le domaine kinase et le résidu glycine en 468 dans le domaine d'activation.

Les mutations de BRAF sont mutuellement exclusives de celles de l'EGFR et de KRAS.

Le mécanisme d'action repose sur une activité kinase augmentée et donc une activation constitutive des MAP kinases sous-jacentes.

Le type histologique de ces tumeurs est préférentiellement lépidique et papillaire[119].

A l'heure actuelle de nombreuses molécules sont en phase de développement notamment le sorafenib dans l'étude de phase 3 ESCAPE mais qui n'a pas montré de résultats significatifs [120].

4. PI3K:

La famille des phosphatidylinositol-3-kinase sont des kinases lipidiques qui activent les phosphatidylinositol-3-phosphate, clés entre les récepteurs aux facteurs de croissance et

les voies de signalisation intracellulaire. PI3K est un activateur d'Akt, qui régule la survie cellulaire tumorale. La voie PI3K-Akt joue un rôle primordial dans les cancers du poumon. La principale sous-unité catalytique de PI3K est l'isoforme p110 α , dont le gène codant est le PIK3CA [111].

Les mutations de ce gène ont été identifiées dans 30% de glioblastomes et cancers gastriques et dans moins de 2% des cancers bronchiques non à petites cellules.

Elles touchent alors fréquemment le résidu glucine en 542 ou 545 de l'exon 9 et l'exon 20 codant pour l'unité catalytique [121]. Elles sont aussi fréquentes dans les adénocarcinomes que les carcinomes épidermoïdes et peuvent survenir dans les tumeurs présentant une mutation pour l'EGFR [122].

Les mutations de PIK3CA induisent une transformation oncogénique cellulaire.

Elles sont facteurs de résistance et de faible survie chez les patients traités par ITK [123].

Actuellement des études précliniques sont en cours sur certaines molécules thérapeutiques [124], notamment BEZ235 ciblant les protéines PI3K et mTOR et ayant montré une activité anti-tumorale chez la souris [125].

5. EML4-ALK :

L'étude de Soda et coll a permis d'identifier en 2007 un gène résultant de la fusion du gène codant pour « echinoderme microtubule-associated protein like 4 » dans sa portion N-terminale (EML4) et la portion intracellulaire du récepteur tyrosine kinase codée par le gène « anaplastic lymphoma kinase » (ALK) [126]. Cette fusion résulte d'une petite inversion à l'intérieur du chromosome 2p qui relie l'intron 13 d'EML4 et l'intron 19 d'ALK [inv(2)(p21 ;p23)] et aboutissant à un gain de fonction d'une tyrosine kinase chimérique oncogénique [127].

Le transcrit de fusion serait détecté dans environ 5% des cancers non à petites cellules [52].

Les tumeurs porteuses de la translocation EML4-ALK touchent plus les hommes, les patients jeunes, les non-fumeurs. Il s'agit de tumeurs de petite taille et présentant un sous-type histologique acineux, à cellules en bague à chaton ou solide avec une présence de mucus intra ou extra-glandulaire [128].

Ces mutations sont mutuellement exclusives des mutations EGFR, KRAS, HER2 ET BRAF [28].

La détection du transcrit EML4-ALK se fait actuellement par immunohistochimie avec un contrôle positif par FISH (hybridation in situ par fluorescence) [129]. La FISH nécessite l'utilisation de deux sondes marquées en « break-apart », c'est-à-dire situées sur les deux côtés opposés au point de cassure du gène ALK. Mais ce signal est parfois difficile à

interpréter. La RT-PCR ne fait pas partie des techniques de référence car le nombre de primers est trop important pour détecter tous les transcrits de fusion connus [85, 130-132]. S'en sont suivies de nombreuses études sur des potentiels inhibiteurs de ALK, comme PF-02341066 ou crizotinib qui inhibe à la fois ALK et MET. L'étude de phase I de Kwak a montré un taux de réponse allant jusqu'à 64% et un taux de contrôle de la maladie de 90% [133]. Une étude de phase I/II montra un taux de contrôle de la maladie de 58% [134]. Le crizotinib a peu d'effets secondaires (principalement des troubles digestifs et des troubles visuels).

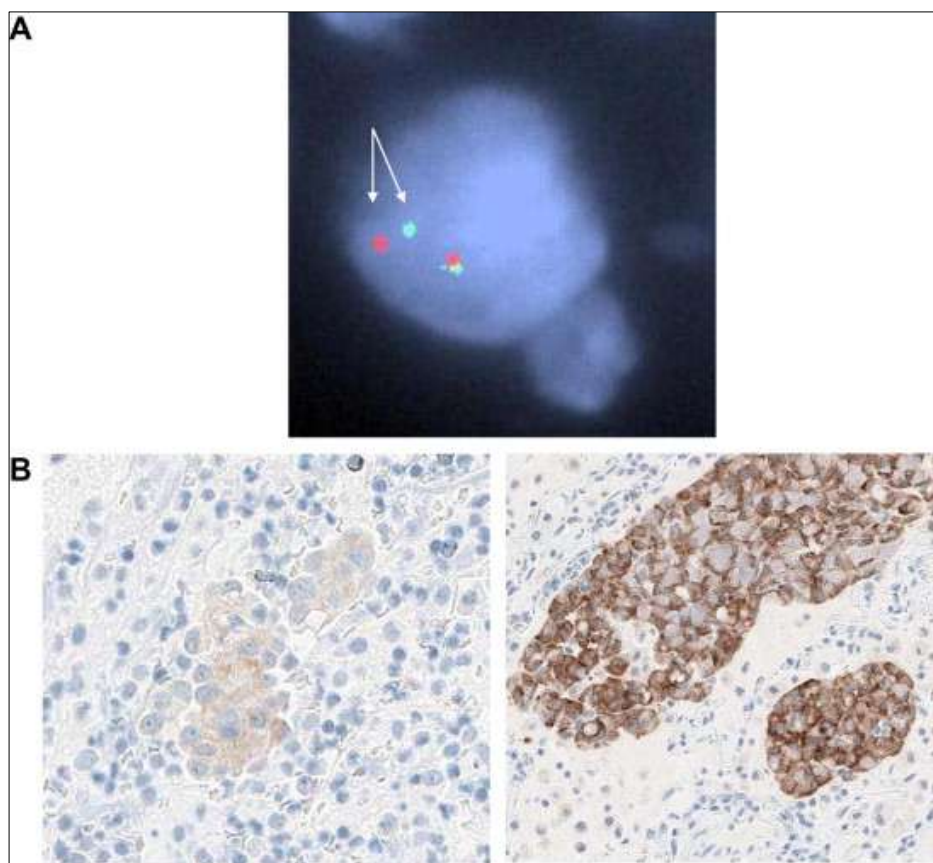


Figure 31: méthodes de diagnostic du transcrit de fusion EML4-ALK dans les cancers du poumon. (A) FISH : analyse avec la sonde ALK break-apart. (B) IHC : analyse avec l'anticorps D5F3 (Cell Signalling Technology41)

6. L'amplification de MET :

La protéine MET contribue à la résistance primaire et secondaire au traitement par ITK [135]. MET est localisée sur le chromosome 7q21, qui code pour une tyrosine kinase, « hepatocyte growth factor receptor » (HGFR). Son amplification est liée à une résistance acquise grâce à un switch des tyrosine kinases. Elle est retrouvée chez 20 % des patients résistants au traitement. Elle survient dans les adénocarcinomes et les carcinomes épidermoïdes. L'identification de cette amplification a conduit au développement d'ITK ciblant l'HGFR [136].

XVI. Les inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK) :

1. Les molécules :

Il s'agit de deux petites molécules inhibitrices de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR : gefitinib (Iressa®, AstraZeneca International) et erlotinib (Tarceva®, OSI Pharmaceuticals). Elles agissent en empêchant la fixation de l'ATP au niveau du site de l'EGFR par compétition.

2. En 1^{ère} ligne de traitement :

Ils ont prouvé leur efficacité en 1^{ère} ligne en comparaison à la chimiothérapie conventionnelle à base de sels de platine chez les patients présentant une mutation du gène de l'EGFR.

| Etude | Population | Traitement | Hazard Ratio (CI=95%) | RR % |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IPASS [38] | 1217 cas, Asiatiques, Non ou anciens fumeurs (<15PA), Adénocarcinome | Gefitinib versus carboplatine/gemcitabine | <u>Global</u> : 0,74 (0,65-0,85) p<0,0001 <u>EGFR muté</u> : 0,48 (0,36- 0,64) P<0,0001 <u>EGFR non muté</u> : 2,85 (2,05-3,98) P<0,0001 | <u>Global</u> : 43 vs 32,2% p=0,0001 <u>EGFR muté</u> : 71,2 vs 47,3 P=0,0001 <u>EGFR non muté</u> : 1,1 vs 23,5% P<0,01 |
| First-SIGNAL [137] | 309 cas, Asiatiques, Non ou anciens fumeurs (<15PA), Adénocarcinome | Gefitinib versus cisplatine/gemcitabine | <u>Global</u> : 0,737 (0,580- 0,938) p<0,01 | |

| | | | | |
|----------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| WJTOG3405 [138] | 172 cas EGFR muté | Gefitinib versus cisplatine/docetaxel | 0,489 (0,336- 0,710) p<0,0001 | 62,1 vs 32,2% P<0,0001 |
| NEJ002 [139] | 228 cas, EGFR muté | Gefitinib versus carboplatine/paclitaxel | 0,30 (0,22- 0,41) p<0,001 | 73,7 vs 30,7% p<0,001 |
| OPTIMAL [140] | 154 cas, EGFR muté | Erlotinib versus carboplatine/gemcitabine | 0,164 p<0,0001 | 83 vs 36% p<0,0001 |
| EURTAC [141] | 174 cas, EGFR muté | Erlotinib versus chimiothérapie à base de sels de platine | 0,42 p<0,0001 | 54,5 vs 10,5% p<0,0001 |

Tableau 4: différentes études de phase III comparant les ITK à la chimiothérapie conventionnelle à base de sels de platine en 1^{ère} ligne de traitement dans les CBNPC avancés

3. En 2^e ou 3^e ligne ou en traitement de maintenance :

Des résultats similaires ont été observés en 2^e ou 3^e ligne de traitement et même en traitement de maintenance dans l'étude BR.21 et l'étude SATURN [66, 142].

4. Indications :

Gefitinib (Iressa®) est indiqué chez les adultes dans le traitement du CBNPC localement avancé ou métastatique avec mutations activatrices du gène de l'EGFR.

Erlotinib (Tarceva®) est indiqué en monothérapie dans le traitement de maintenance des formes localement avancées ou métastatiques du CBNPC chez les patients avec une maladie stable après 4 cycles d'une première ligne de chimiothérapie standard à base de sels de platine. Il est également indiqué dans le traitement des formes localement avancées ou métastatiques du CBNPC après échec d'au moins une ligne de chimiothérapie. Le bénéfice a été démontré dans les tumeurs avec mutations activatrices du gène de l'EGFR.

5. Effets secondaires :

a) Gefitinib :

Dans les données résumées des études cliniques de phase III ISEL, INTEREST et IPASS (2462 patients traités par Iressa), les effets indésirables les plus fréquemment rapportés, survenant chez plus de 20 % des patients, sont une diarrhée et des réactions cutanées (incluant éruption cutanée, acné, sécheresse cutanée et prurit). Les effets indésirables se manifestent habituellement au cours du premier mois de traitement et sont généralement réversibles. Environ 8 % des patients ont développé un effet indésirable sévère. Environ 3 % des patients ont arrêté le traitement suite à un effet indésirable.

b) Erlotinib :

Dans une étude randomisée en double aveugle (BR 21 : Tarceva en deuxième ligne de traitement), les effets indésirables le plus fréquemment observés ont été des éruptions cutanées (75 %) et des diarrhées (54 %). La plupart ont été de grade 1/2 et n'ont pas nécessité d'intervention spécifique.

6. Arbre décisionnel dans les CBNPC de stade IV :

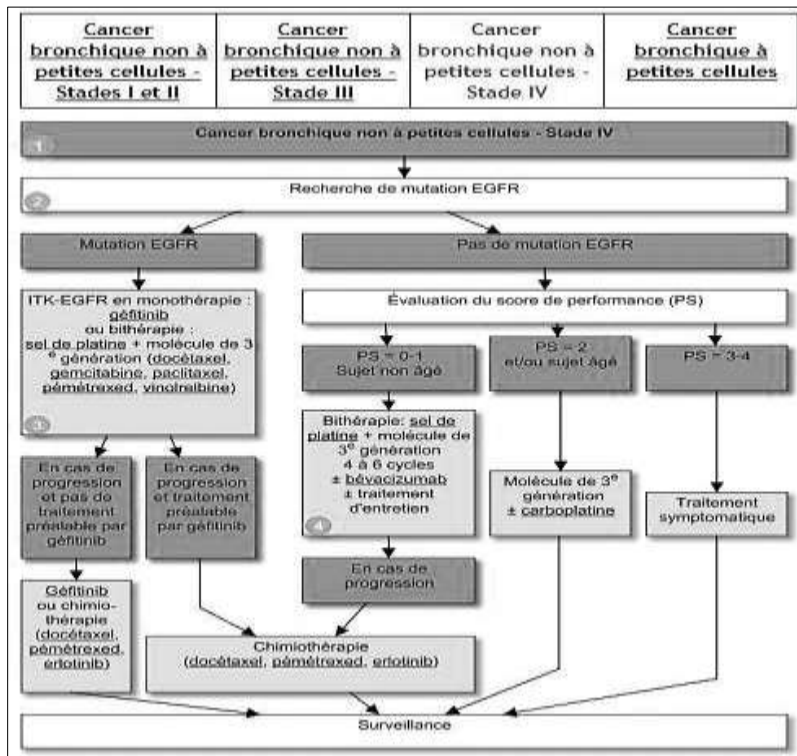


Figure 32 : arbre décisionnel de prise en charge des CBNPC de stade IV selon l'ONCOLOR [16]

7. Mécanismes de résistance aux ITK :

Malgré un taux de réponse clinique initial important, les patients atteints d'un adénocarcinome avec une mutation EGFR développent inévitablement une résistance aux drogues environ 1 an après le début du traitement [143]. Les études montrent plusieurs mécanismes moléculaires qui peuvent contribuer au développement d'une résistance aux ITK, incluant les mutations acquises secondaires du gène de l'EGFR, l'activation d'autres voies de signalisation qui court-circuite la voie EGFR, la surexpression de HGF, l'amplification de la protéine MET, les facteurs épigénétiques, l'activation constitutive de la voie EGFR, des altérations du stroma tumoral ou de la matrice extra-cellulaire, ou des mécanismes liés à l'hôte comme l'inactivation rapide des drogues.

a) Résistance primaire :

Environ 10-25 % des tumeurs avec mutation EGFR, ne répondent pas au traitement [69]. Les insertions dans l'exon 20 du gène de l'EGFR sont une des principales causes de résistance primaire. Les autres altérations génétiques perturbant le signal de la voie EFGR, sont les mutations de KRAS, PIK3CA et BRAF et la perte d'expression de PTEN (10 %), médiée par un mécanisme épigénétique.

b) Résistance acquise :

Il existe 2 mécanismes principaux : des mutations secondaires du gène de l'EGFR acquises au cours du traitement et qui modifient la séquence codante de la protéine (T790M) ; l'amplification de voies de signalisation d'autres oncogènes, comme RAS et MET.

Dans ce contexte, mon travail de thèse a consisté à :

- Recenser le nombre et le type de mutations chez 1000 patients lorrains atteints d'adénocarcinomes, pris en charge entre avril 2010 et août 2011 par la plateforme d'Oncologie Moléculaire du CHU-CAV de Nancy ;
- Décrire la population présentant une mutation du gène de l'EGFR selon des critères cliniques et histologiques ;
- Décrire le protocole de Biologie Moléculaire mis en place au niveau de la plateforme ;
- Mettre au point et évaluer la place de l'immunohistochimie dans la recherche des mutations du gène de l'EGFR, notamment au point de vue financier ;
- Estimer l'intérêt de l'évaluation de la richesse tumorale par les pathologistes lors de l'étape préanalytique de la biologie moléculaire ;
- Approcher la pratique de la prescription des inhibiteurs de la tyrosine kinase chez les patients présentant une mutation du gène de l'EGFR.

MATERIEL ET METHODES

I. Sélection des patients :

1000 patients atteints d'un adénocarcinome pulmonaire primitif présumé, dont la tumeur a fait l'objet d'une recherche de mutations du gène de l'EGFR ont été inclus dans l'étude. Il s'agit d'une étude rétrospective. Les prélèvements sont issus de 1000 demandes consécutivement adressées à la plateforme de génétique moléculaire des cancers du Centre Hospitalo-Universitaire de Nancy entre avril 2010 et août 2011.

6 patients n'ont pas été inclus pour diverses raisons :

- 1 demande déjà réalisée,
- 2 demandes d'autres types de mutations : GIST et KRas,
- 1 demande concernant un carcinome épidermoïde,
- 3 demandes dont le matériel envoyé ne correspond pas à un matériel tumoral.

Ces 1000 prélèvements correspondent à 996 patients (4 d'entre eux présentant deux adénocarcinomes synchrones).

Lors de l'étape préanalytique, le diagnostic histologique a été redressé dans un certain nombre de cas. En effet 16 tumeurs correspondaient en fait à des carcinomes épidermoïdes et 1 tumeur à un carcinoïde atypique. 2 tumeurs correspondaient à des primitifs extra-pulmonaires (colique et pancréatique). L'étude statistique de notre population se fera donc sur 981 patients et non 1000.

1. Origine des prélèvements :

Les prélèvements proviennent de toute la région Lorraine. 623 prélèvements ont été transmis par les laboratoires de pathologie d'établissements du secteur libéral et 358 d'établissements publics ou semi-publics (hôpital Central, hôpital Brabois, hôpital Bel Air à Thionville, hôpital Bon Secours à Metz et Centre Alexis Vautrin).

2. Statut clinique des patients :

Les prélèvements concernent 626 hommes et 355 femmes.

L'âge minimal est de 30 ans et l'âge maximal de 90 ans.

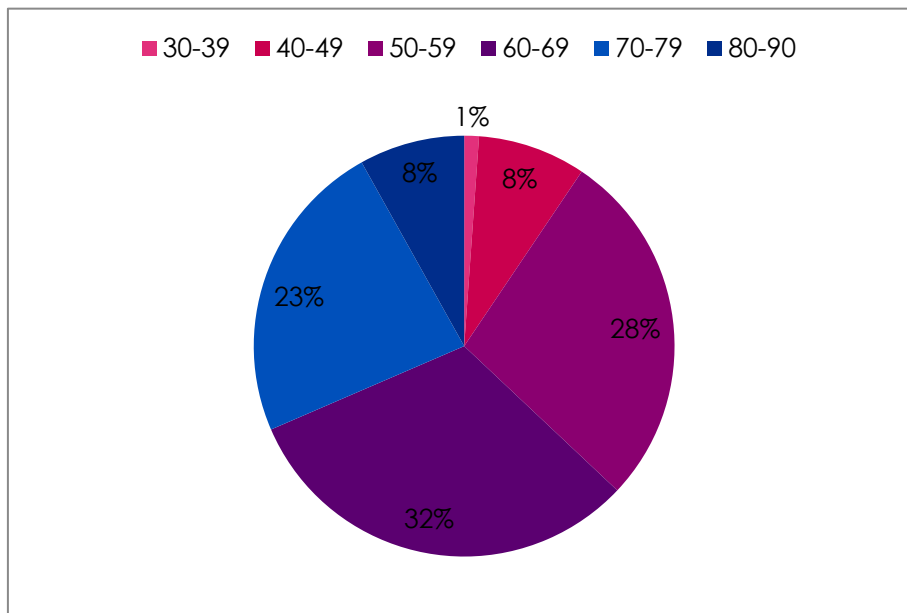


Figure 33: diagramme des âges de notre population

3. Type de prélèvements :

a) Exérèse :

339 prélèvements concernent une pièce d'exérèse dont 283 pièces de résection pulmonaire (pneumectomies et lobectomies majoritairement et 20 exérèses atypiques) et 56 pièces d'exérèse extra-thoracique (dont 24 adénectomies, 14 métastases cérébrales, 11 métastases pleurales, 3 sous-cutanées, 1 pariétale, 1 osseuse, 1 méningée et 1 cutanée).

b) Biopsies :

629 prélèvements concernent un matériel biopsique :

- 278 biopsies bronchiques,
- 198 ponctions transpariétales.

153 biopsies extra-thoraciques par fréquence décroissante : 49 biopsies pleurales, 41 médiastinobiopsies, 15 biopsies osseuses, 14 biopsies hépatiques, 12 biopsies ganglionnaires, 11 biopsies ganglionnaires sous échocytologie, 5 biopsies cérébrales, 2 biopsies surrénaliennes, 2 biopsies musculaires, 1 biopsie transcutanée ganglionnaire et 1 biopsie trachéale.

c) Cytologie :

13 prélèvements concernent de la cytologie avec 11 liquides pleuraux, 1 aspiration bronchique et 1 liquide péricardique.

4. Sites primaires versus secondaires :

760 prélèvements ont ciblé le site primitif de la tumeur pulmonaire.

221 prélèvements concernent une localisation secondaire métastatique, dont 89 métastases ganglionnaires, 71 pleurales, 19 cérébrales, 16 osseuses, 14 hépatiques, 3 sous-cutanées, 2 surrénaliennes, 2 musculaires, 1 cutanée, 1 méningée, 1 pariétale, 1 péricardique et 1 trachéale.

5. Types histologiques :

Les prélèvements concernent presque exclusivement des adénocarcinomes, dans 941 cas. Les tumeurs non-adénocarcinomeuses concernent 28 carcinomes non à petites cellules NOS, 9 carcinomes à grandes cellules, 2 carcinomes pléomorphes associés à un contingent adénocarcinomeux et 1 carcinome adénosquameux.

6. Sous-types histologiques :

Après double-relecture des 339 lames correspondant aux pièces opératoires, il a été possible de sous-typé les prélèvements en se basant sur la nouvelle classification histologique des adénocarcinomes selon l'IASLC/ATS/ERS (115).

Il a été dénombré comme sous-type prépondérant, lorsque cela était possible, 136 architectures acineuses, 117 solides, 39 papillaires, 16 lépidiques, 10 micropapillaires, 7 mucineux, 1 sous-type colloïde.

7. Immunohistochimie :

Parmi les 941 prélèvements d'adénocarcinome, 752 expriment l'antigène TTF1 contre 181 ne l'exprimant pas. Le statut TTF1 n'a pu être précisé dans 8 cas.

II. Procédure de prise en charge des prélèvements :

Les prélèvements sont acheminés au laboratoire de Pathologie de l'hôpital Central du CHU de Nancy.

La majorité des prélèvements ont été au préalable fixés dans du formol à 10% (v/v) tamponnée pH 7,4. 28 prélèvements ont été fixés avec un fixateur autre que le formol, comme

l'AFA ou formol acide acétique. Tous les prélèvements ont été inclus en paraffine. Il est réalisé une coupe histologique de 4 µm colorée par HES (hématoxyline, éosine et safran) et 3 lames blanches pour une possible immunohistochimie.

Ils sont ensuite pris en charge par les techniciennes de la plateforme d'Oncologie Moléculaire du CHU-CAV de Nancy à raison de 2 fois par semaine, les lundis et jeudis. La technique de recherche des mutations du gène de l'EGFR s'étale sur 3 jours maximum. En effet, les résultats des cas sans mutation peuvent être faxés aux cliniciens à J3. Les cas présentant sans mutation sont vérifiés par une technique différente et les résultats peuvent être faxés à J3 au soir ou à J4. Les résultats sont dans un deuxième temps envoyés par courrier aux cliniciens et correspondants.

Au final, la durée de la prise en charge entre le moment de la réception du prélèvement et le rendu du résultat au clinicien est au maximum de 4 jours.

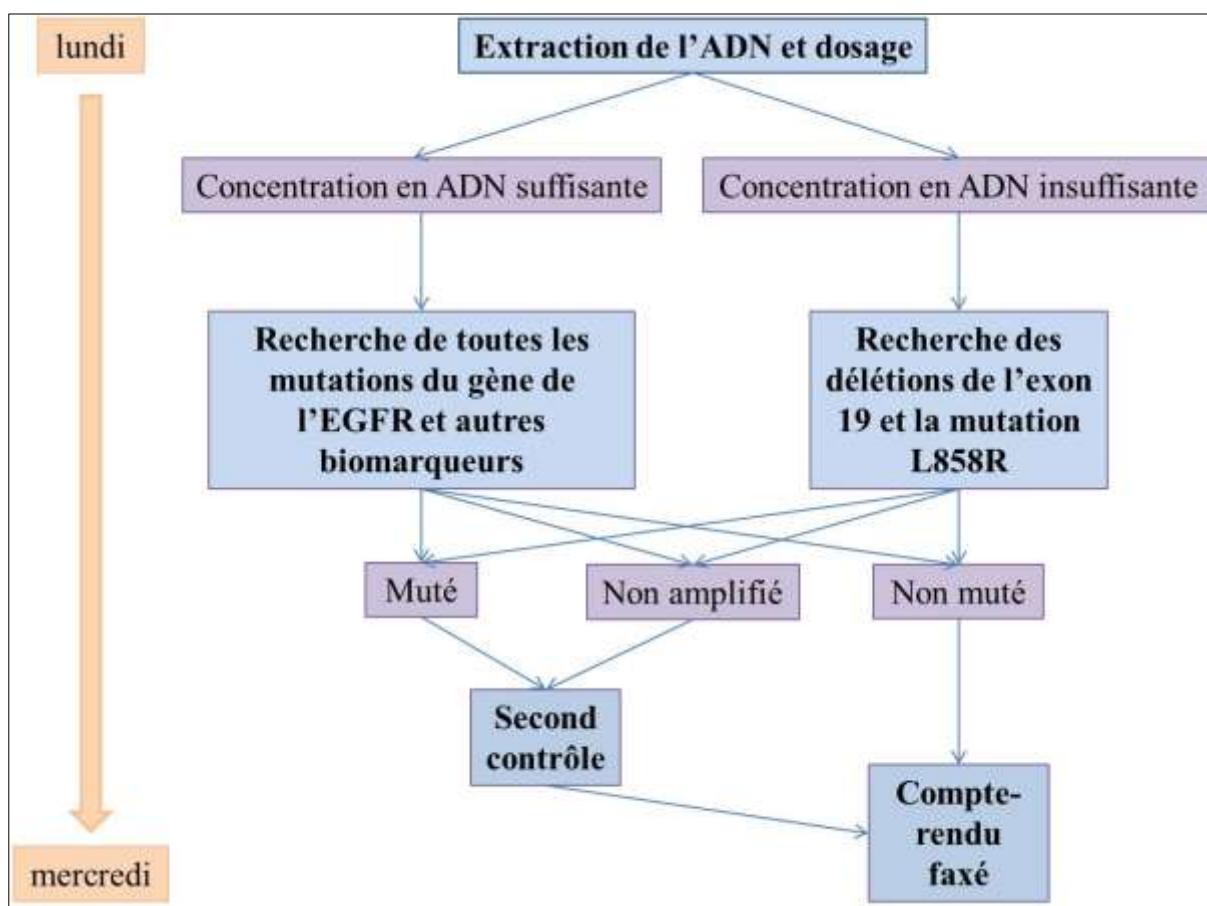


Figure 34: procédure et délai de la technique de recherche des mutations du gène de l'EGFR et autres biomarqueurs par la plateforme d'Oncologie Moléculaire du CHU-CAV de Nancy

III. Technique de référence : la biologie moléculaire au sein de la plateforme d'Oncologie Moléculaire du CHU De Nancy:

1. Etape préanalytique :

Il est réalisé une lame en histologie standard à partir du bloc de paraffine. Une coupe de 5 μ m réalisée au microtome est colorée par des bains successifs d'hématoxyline-éosine-safran (HES).

Une zone représentant environ 100 mm², est sélectionnée et cerclée sur la lame HES en fonction de la richesse tumorale et de l'absence de nécrose tumorale. La richesse tumorale est évaluée de manière subjective, en pourcentage par le pathologiste.



Figure 35: lame avec coupe de la tumeur colorée à l'hématoxyline-éosine-safran (HES) et zone sélectionnée par le pathologiste

2. Extraction de l'ADN à partir de tissus fixés inclus en paraffine avec le kit NucleoSpin® FFPE DNA Macherey-Nagel™ :

a) Préparation des échantillons : déparaffinage :

Il est réalisé des copeaux de 10 μ m au niveau du bloc de paraffine dans la zone délimitée par le pathologiste. Le nombre de sections réalisées est fonction de l'aire du bloc. Lorsque les prélèvements sont de petite taille, il est alors nécessaire d'utiliser le ruban de paraffine car aucune microdissection n'est possible.

Le nombre de coupes adéquat est déposé dans un tube Eppendorf (1.5 ou 2 ml), dans lequel il est ajouté 400 µl de Paraffin Dissolver, fourni avec le kit, puis incubé 3 min à 60°C. Le tube est ensuite vortexé immédiatement à 60°C° et vigoureusement afin de dissoudre la paraffine, puis laissé refroidir à température ambiante.



Figure 36: zone de section sur le bloc inclus en paraffine de la tumeur

b) Digestion par la protéinase K :

Le tampon de lyse rompt les membranes cellulaires et libère le contenu cytoplasmique et nucléaire, puis les protéines sont dégradées par la protéinase K. Cette enzyme est une protéase végétale très active même en présence d'EDTA, et qui n'a aucun effet d'hydrolyse sur les acides nucléiques (ADN). Elle hydrolyse les protéines de toutes origines en quelques heures, avec une préférence pour les liaisons peptidiques situées après les acides aminés hydrophobes (leucine, par exemple).

Il est ajouté 100 µl de tampon FL, puis vortexé vigoureusement avant centrifugation de 1 min à 11 000 g pour jeter la phase supérieure organique. 10 µl de protéinase K sont ajoutés à la phase inférieure aqueuse qui a été conservée et mélangés consciencieusement par aspiration-refoulement avant incubation de 3 h à température ambiante. S'il reste des particules tissulaires visibles, il est rajouté 10 µl de protéinase K et l'incubation est prolongée sur la nuit. Sinon les tubes sont conservés à -20°C.

c) Réversion de la fixation formolée :

Il est ajouté 100 µl de Decrosslink Buffer D-link, fourni avec le kit, puis vortexé doucement avant centrifugation de 30 sec à 11 000 g et incubation de 30 min à 90°C. L'échantillon est

ensuite vortexé 5 sec et laissé revenir à température ambiante. Ajustement des conditions : il est ajouté 200 µl d'éthanol (96-100%) avant de vortexer 2 x 5 sec et centrifuger pendant 30 sec à 11 000 g pour obtenir la séparation de 2 phases.

d) Accrochage de l'ADN à la membrane :

Au cours de ces vingt dernières années, de très nombreux procédés d'extraction des acides nucléiques ont été décrits, et des kits sont actuellement proposés par un certain nombre d'industriels. L'objectif de ces méthodes de purification est notamment d'éliminer les contaminants qui pourraient perturber les techniques ou réactions effectuées par la suite. Par exemple, l'hème est un puissant inhibiteur de la Taq polymérase, qu'il est nécessaire d'éliminer au cours de l'extraction. Il en est de même de l'héparine.

Les méthodes d'extraction des acides nucléiques peuvent se classer en quatre principales classes en fonction du principe auquel elles font appel : les méthodes utilisant des solvants organiques, les méthodes utilisant des solvants non organiques, les méthodes basées sur l'utilisation de billes magnétiques et les méthodes basées sur l'utilisation de microcolonnes de résines échangeuses d'ions [144].

La technique utilisée à Nancy fait appel à cette dernière méthode avec des colonnes composées d'une membrane de silice. Les différentes étapes sont la dissolution de la paraffine, la digestion du tissu fixé par la protéinase K pour relargage de l'ADN, la mise en simple brin de l'ADN par incubation avec la chaleur, la liaison de l'ADN à la colonne, lavage, élution et récupération de l'ADN [145].

Ces méthodes d'extraction et de purification des acides nucléiques sont les dernières récemment apparues. Elles sont basées sur la propriété qu'ont les particules de silice d'adsorber sélectivement les acides nucléiques. Les solutions de lavage permettent de se débarrasser des contaminants tels que l'hémoglobine, les protéines plasmatiques ou les ions Fe^{2+} .

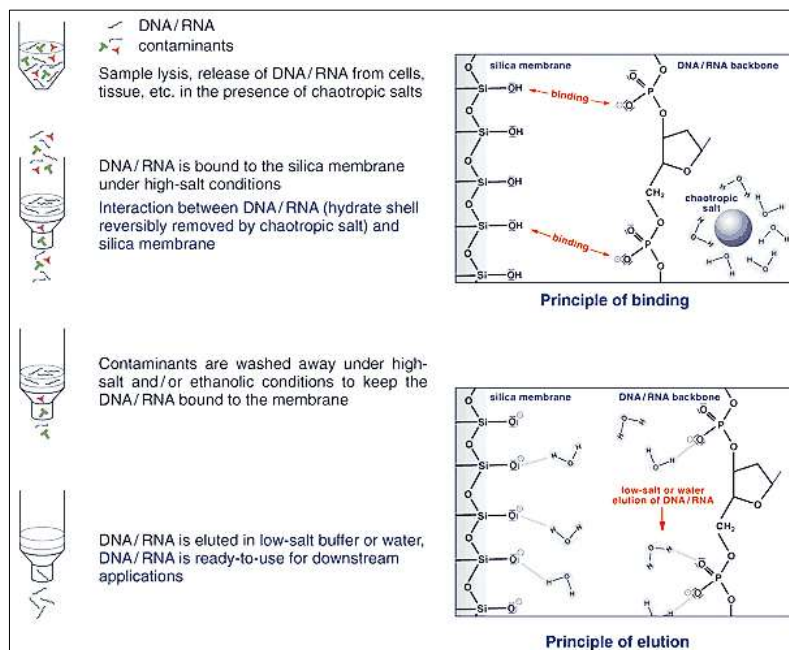


Figure 37: principe de l'extraction par colonne avec résine échangeuse d'ion [145]

Même si le rendement est inférieur à celui de la technique d'extraction avec solvant organique, la technique des microcolonnes est plus simple, plus rapide et plus pratique en terme de manipulation de produits toxiques [146].

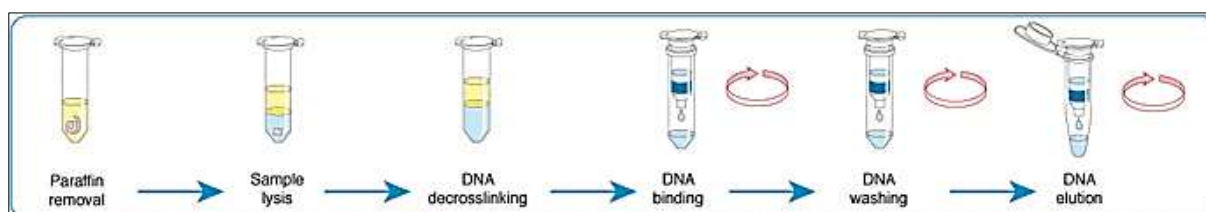


Figure 38: schéma des différentes étapes d'extraction [145]

La colonne NucleoSpin® est placée dans son tube de collection de 2 ml. Toute la phase inférieure aqueuse est récupérée et placée dans la colonne NucleoSpin® (environ 410 µl) avant d'être centrifugée pendant 30 sec à 2000 g. L'éluat est jeté avec le tube collecteur et la colonne est mise dans un nouveau tube de 2 ml.

e) Lavage et séchage de la membrane :

400 µl de tampon B5 sont déposés dans la colonne, centrifugée pendant 30 sec à 11 000 g. L'éluat et le tube sont jetés et la colonne est remise dans un nouveau tube de 2 ml. Il est redéposé 400 µl de tampon B5 dans la colonne avant centrifugation pendant 2 min à 11 000g

pour sécher la colonne. L'éluât et le tube sont jetés et la colonne est placée dans un nouveau tube de 1.5 ml.

f) Elution de l'ADN :

Il est déposé 20 µl (entre 5 et 30 µl) de tampon BE au centre de la membrane de la colonne avant centrifugation de 30 sec à 11 000 g. L'ADN se retrouve dans l'éluât, il est prêt à être dosé. La colonne peut être jetée.

g) Pureté et dosage de l'ADN :

La contamination de l'ADN extrait par des protéines a été appréciée en mesurant la densité optique des extraits à 260 et 280 nm sur spectrophotomètre et en effectuant le rapport DO 260 nm/DO 280 nm.

3. Protocole des techniques de biologie moléculaire :

en y associant pour chaque série de cas, un témoin positif pour la délétion de 15 pb de l'exon 19 (lignée cellulaire H1650), un témoin positif pour les mutations T790M de l'exon 20 et L858R de l'exon 21 (lignée cellulaire H1975) et un témoin blanc sans ADN pour vérifier l'absence de contamination par le matériel et produits.

Si la concentration en ADN est suffisante, l'ensemble des mutations du gène de l'EGFR sont recherchées ainsi que celles des autres biomarqueurs (Her2, PI3KCA, KRas et BRaf) par différentes techniques d'analyse de l'ADN.

Si la concentration en ADN est faible ou nulle, seules les délétions de l'exon 19 et la mutation ponctuelle L858R de l'exon 21 sont recherchées, puisque celles-ci représentent la grande majorité des mutations du gène de l'EGFR.

Les cas positifs pour une mutation sont vérifiés par une deuxième technique différente de biologie moléculaire.

Les cas non amplifiés sont contrôlés et la qualité d'ADN est contrôlée sur gel d'agarose.

Le déroulement de ces techniques s'étend sur 4 jours au total jusqu'à la remise au clinicien d'un compte-rendu de biologie moléculaire comportant une double-signature par le pathologiste ou le biologiste et l'ingénieur de biologie moléculaire.

4. PCR en temps réel par la méthode TaqMan :

a) Indications :

Elle est réalisée à la recherche de 8 mutations ponctuelles réparties sur les exons 18, 20 et 21 : G719C, G719S, G719A ; T790M et G796A ; L861R, L861G, L858R.

b) Principe :

La sonde TaqMan possède deux fluorophores : un fluorophore appelé « Reporter » (cercle vert: VIC, FAM (bleu)) et un fluorophore appelé « Quencher » (cercle rouge: TAMRA) : cette dernière molécule, lorsqu'elle est très proche, empêche d'observer le signal que pourrait émettre le reporter.

Le spectre d'émission du fluorophore (donneur) chevauche le spectre d'excitation du Quencher (accepteur). Plus grand est le chevauchement des spectres, meilleur est le phénomène de Quenching. Sans proximité de Quencher, un signal est mesuré à la longueur d'onde d'émission du fluorophore. Par la proximité du « Quencher », l'émission du « Reporter » est atténuée (« quenchée », éteinte), suite au transfert d'énergie par FRET (Fluorescent resonance energy transfer) entre ces éléments.

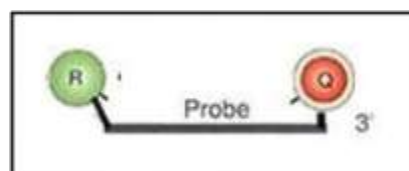


Figure 39: une sonde TaqMan

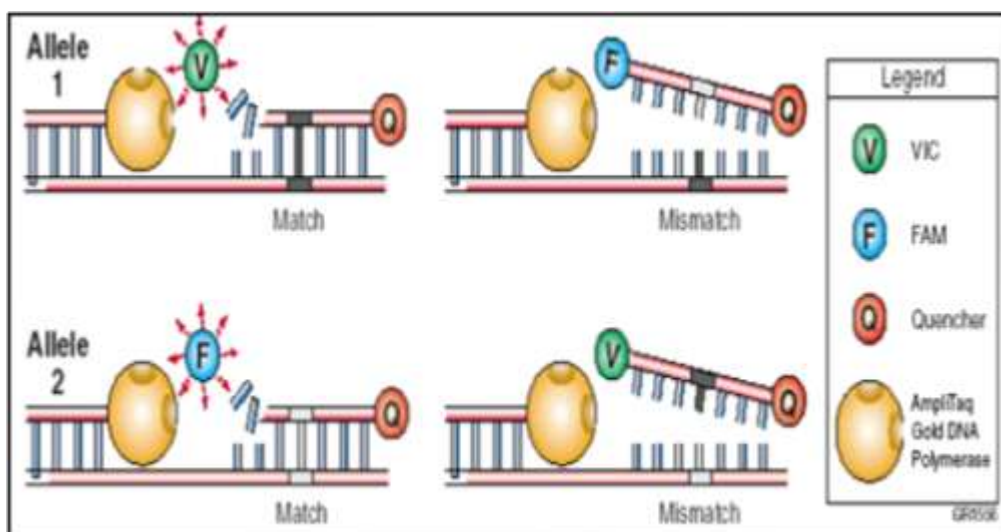


Figure 40: technique PCR allèle spécifique (TaqMan)

Avantages de la technique : rapide puisque l'amplification par PCR et la détection se font dans le même temps et spécifique avec deux sondes spécifiques, soit de la mutation recherchée, soit de la séquence sauvage.

Limites de la technique : nécessité d'un ADN de bonne qualité et en quantité supérieure à 80 ng [88].

c) Protocole :

Elle est réalisée sur le LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Applied System , Mannheim, Germany) en y associant un témoin positif pour les mutations T790M de l'exon 20 et L858R de l'exon 21 (H1975) ainsi qu'un témoin de contamination (tube sans ADN).

d) Résultats :

- Lignée témoin :

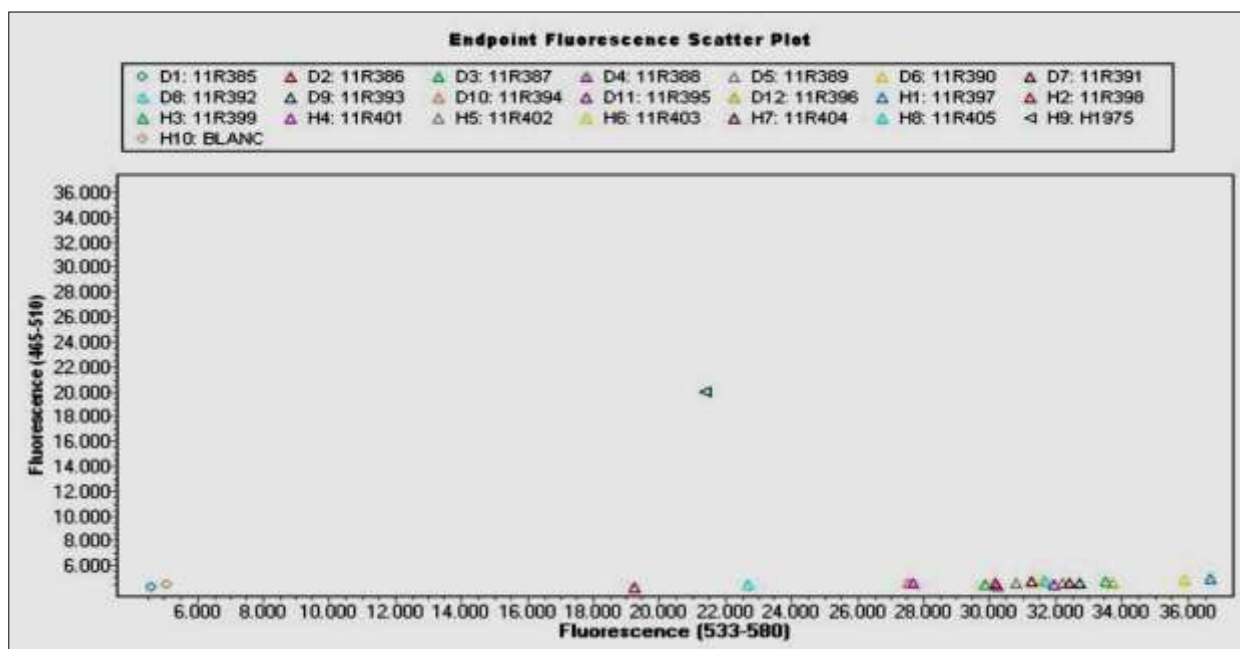


Figure 41: résultats d'une technique TaqMan avec une sonde spécifique de la mutation L858R : absence de cas mutés mis à part le témoin positif qui montre une émission de fluorescence proche de celle de la séquence mutée.

- Patient :

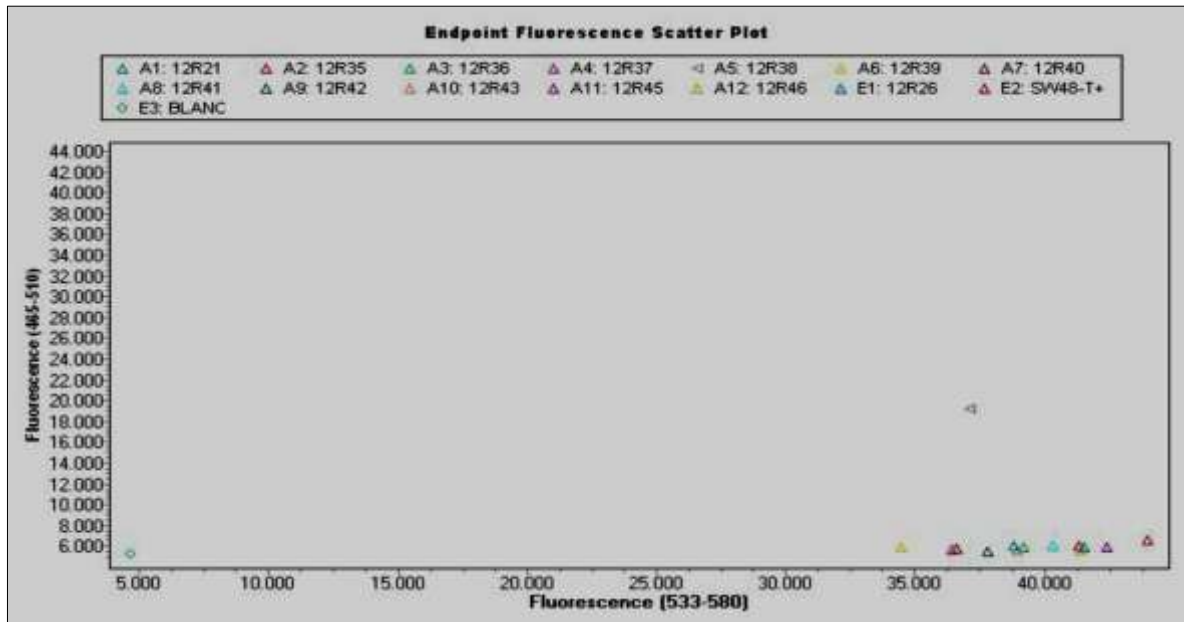


Figure 42 : résultats d'une technique TaqMan avec une sonde spécifique de la mutation L861R : présence d'un patient avec la mutation

5. PCR en temps réel avec analyse de fragments de taille :

a) Indications :

Elle est réalisée à la recherche des délétions de 9, 12, 15, 18 ou 24 pb de l'exon 19 du gène de l'EGFR et des insertions de 3, 6, 9 ou 12 pb de l'exon 20 du gène Her2.

b) Principe :

Il s'agit d'une analyse de fragments de taille des produits de PCR marqués en fluorescence. Les amplicons marqués en fluorescence sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire avec une longueur d'onde d'excitation à 494 nm et une longueur de détection à 522 nm et analysés par un logiciel informatique [147].

Avantages : très sensible, peu cher, rapide et facile [148].

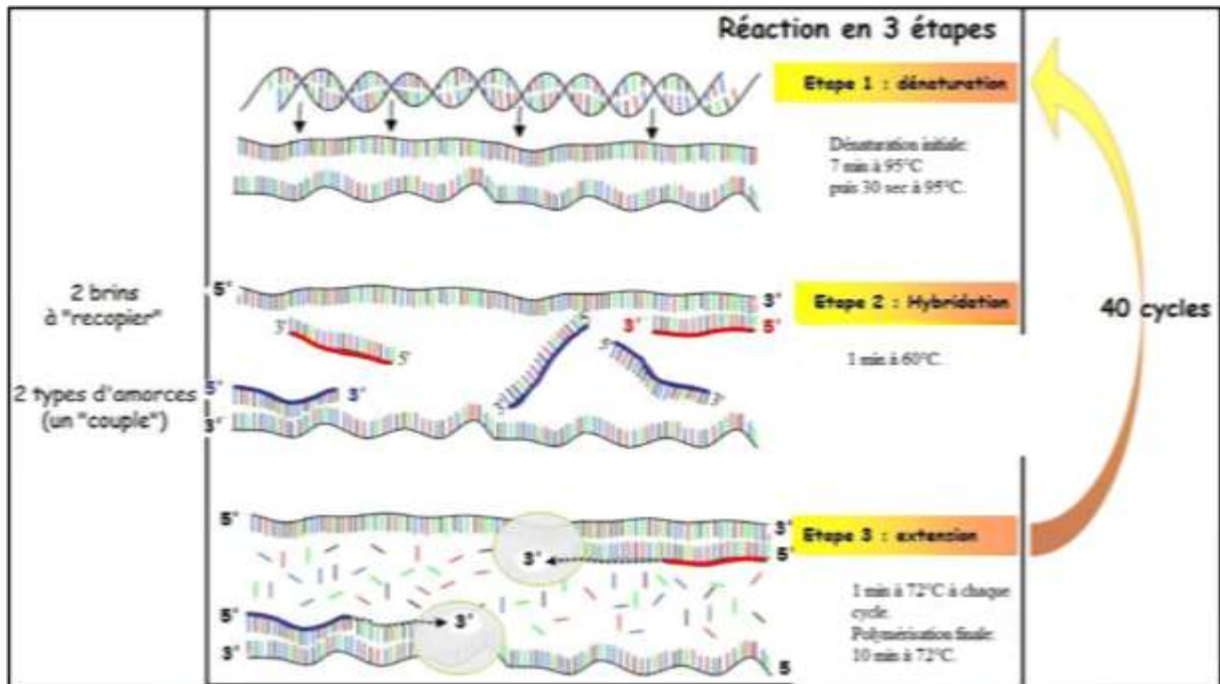


Figure 43 : les 3 étapes de la PCR conventionnelle

c) Protocole :

Il s'agit d'une amplification avec un couple de primers marqués par un fluorochrome. Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse capillaire.

Elle est réalisée en déposant les produits de PCR déjà marqués sur le ABI Prism® 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) en y associant un témoin positif pour la délétion de 9 pb de l'exon 19 du gène de l'EGFR (lignée cellulaire H1650), un témoin positif pour l'insertion de 3 pb de l'exon 20 du gène HER2 (lignée cellulaire H1781) et un témoin de contamination (tube sans ADN). Les résultats sont analysés avec le logiciel informatique Gene Mapper® v3.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

d) Résultats :

- Délétions de l'exon 19 :

La taille attendue du fragment amplifié du gène de l'EGFR non délété est de 207 pb.

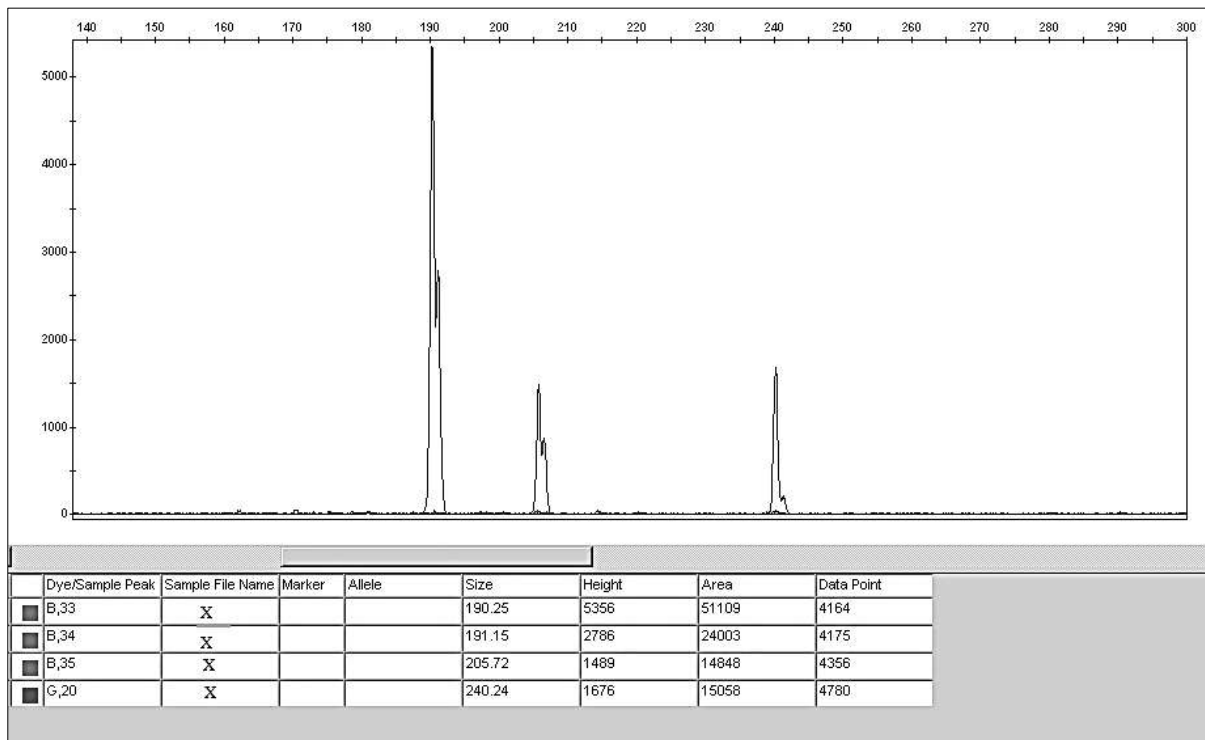


Figure 44 : présence d'un allèle à 190pb correspondant à une délétion de 15pb de l'exon 19. Her2 sauvage.

- Mutations du gène de HER2 :

La taille attendue du fragment du gène HER2 sauvage est de 245 pb.

6. Technique de SnaPshot multiplex :

a) Indications :

Elle est réalisée à la recherche des mutations ponctuelles situées aux nucléotides c34, c35, c37 et c38 sur les codons 12 et 13 de l'exon 2 du gène KRAS, la mutation V600E de l'exon 15 du gène BRAF et les mutations E542K, E545G et E545K de l'exon 9 et H1047R de l'exon 20 du gène PIK3CA.

b) Principe :

Elle se base sur l'extension d'amorce en simple nucléotide à partir de produits ADN amplifiés.

Cette technique consiste en une amplification par PCR, suivie d'une purification. Les produits de PCR sont ensuite mélangés au kit de SnaPshot™ multiplex et au tampon de séquençage en présence des amorces. Ce mélange est placé dans un thermocycleur pour une extension en simple nucléotide. Le produit de la réaction d'extension est traité par une enzyme, la Shrimp

Alcaline Phosphatase (SAP) qui sera ensuite désactivée. Les produits sont séparés en électrophorèse capillaire dont le résultat sera analysé par logiciel informatique [149].

Avantages : sensible, spécifique, rapide et peu coûteuse, nécessite peu de matériel ADN [150].

Cette technique peut détecter jusqu'à 10 mutations ponctuelles simultanément.

Inconvénient : technique nécessitant plusieurs étapes.

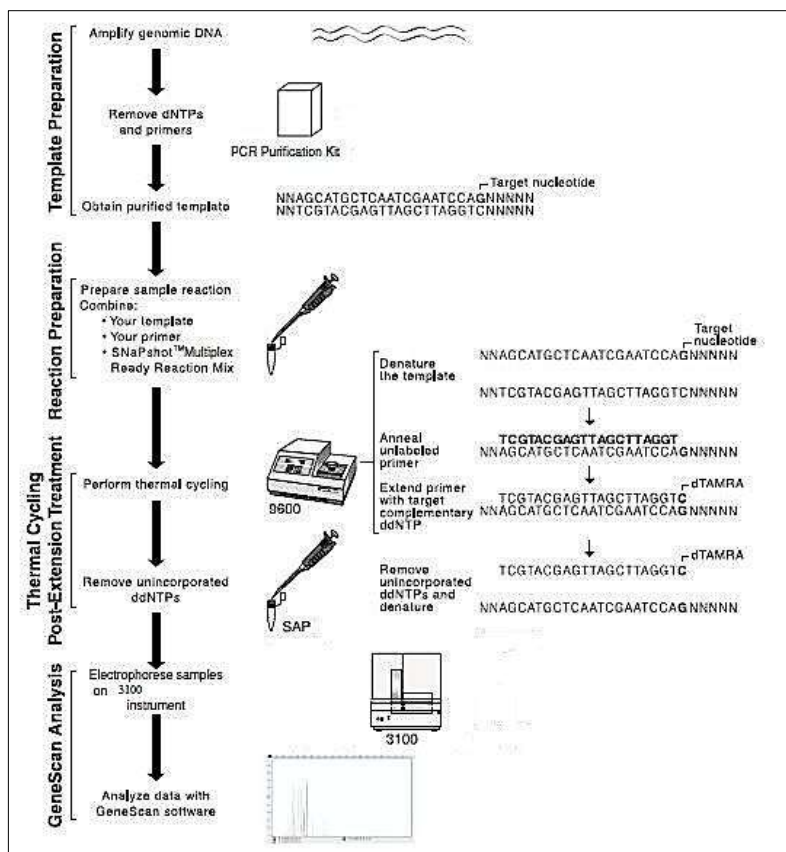


Figure 44: protocole de la technique SnaPshot™ [149]

c) Protocole :

Elle consiste en une technique de PCR en utilisant des amorces double-sens spécifiques de chaque mutation, suivie d'une vérification du produit de PCR sur gel d'agarose et d'une purification avec le kit QIAquick PCR purification® (Qiagen, Valencia, CA, USA) en y associant un témoin positif pour la mutation c34G>A (G12S) de l'exon 2 du gène KRAS (lignée cellulaire A549), un témoin positif pour la mutation V600E de l'exon 15 du gène BRAF (lignée cellulaire HTB38), un témoin positif pour la mutation H1047R de l'exon 20 (lignée cellulaire CAL 29), un témoin positif pour la mutation E545K de l'exon 9 du gène PIK3CA (lignée cellulaire VMCUB) et un témoin de contamination. La réaction est réalisée en présence des produits de la PCR, le kit SnaPshot™ multiplex (Applied Biosystems, Foster

City, CA, USA), le tampon de séquençage Big Dye v3.1, v1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et le mix d'amorces correspondant aux mutations recherchées, au sein d'un thermocycleur. La réaction est ensuite traitée pendant 1h par l'enzyme SAP avant d'être désactivée. La réaction est déposée sur le ABI Prism® 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Les résultats sont analysés avec le logiciel informatique Gene Mapper® v3.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

IV. Etude immunohistochimique :

1. Principe :

Le but de l'immunohistochimie (IHC) est la mise en évidence de protéines sur une coupe de tissu qu'il soit préalablement fixé ou congelé. La protéine est d'abord reconnue par un anticorps primaire spécifique, celui-ci étant secondairement révélé par un montage variable dont le marquage peut se faire soit par réaction colorimétrique soit par un marqueur fluorescent.

Au sein du laboratoire d'Anatomie pathologique du CHRU Hôpital Central de Nancy, le système d'amplification et de révélation utilisé est celui de la technique « Flex+ lapin » EnVision™ FLEX (Dako, Carpinteria, CA, USA). Cette technique utilise un kit commercialisé par Dako et est réalisée sur l'automate Autosteiner Plus Link® Dako. Ce système permet une amplification du signal de 2 à 3 fois par rapport à une technique streptavidine-biotine standard et permet d'éviter un signal non spécifique généré par les biotines endogènes.

Schématiquement l'antigène au niveau du tissu est détecté par un anticorps primaire de lapin. Celui-ci se lie à un anticorps secondaire anti-lapin. Ce dernier se fixe à un polymère composé d'un dextrane lié à des anticorps de chèvre se fixant aux immunoglobulines de lapin et à de multiples molécules de peroxydase. Le montage est ensuite révélé par un système chromogène-substrat avec l'ajout de peroxyde d'hydrogène et de diaminobenzidine (DAB) [151].

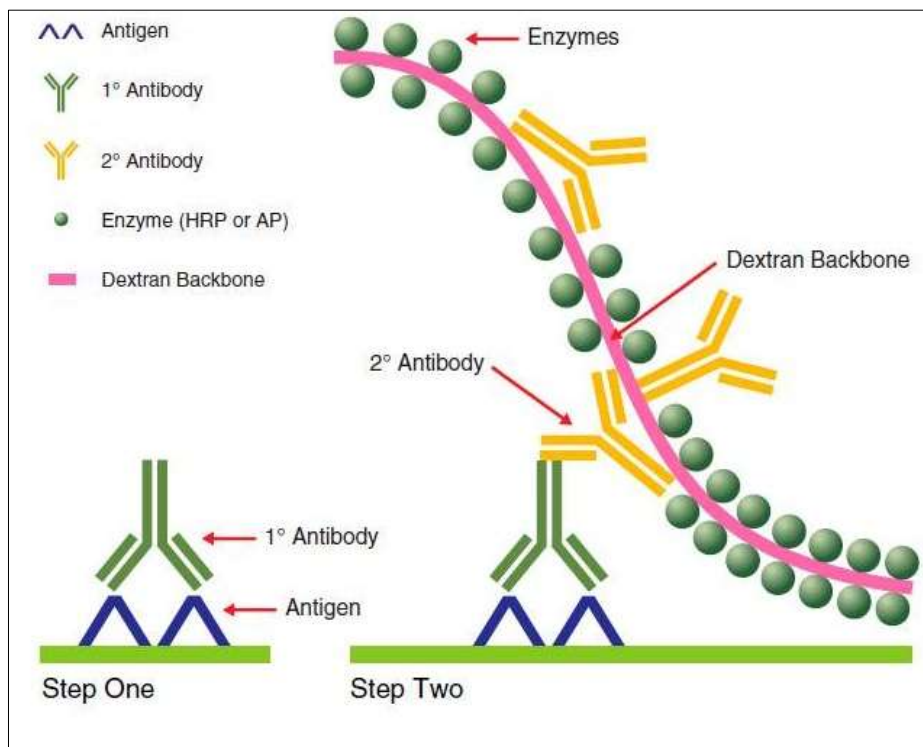


Figure 45: principe de la détection en 2 étapes basée sur le polymère d'HRP [151]

2. Cas testés :

Cette technique a été réalisée en fonction du type de mutation détectée en biologie moléculaire et selon le matériel disponible.

Les cas présentant une mutation de l'exon 19, en englobant l'ensemble des types de délétion, ont été testés avec l'anticorps E746-A750del. En effet il a été mis en évidence que cet anticorps est très spécifique de la délétion de 15pb la plus fréquente mais qu'il aurait également une certaine affinité pour les autres types de délétion de l'exon 19, la sensibilité du test variant de 20 à 67 % pour les délétions non-15pb [61].

Les cas présentant une mutation de l'exon 21 ont été testés avec l'anticorps L858R.

3. Anticorps utilisés :

a) Anticorps E746-A750del :

Il s'agit d'un anticorps monoclonal de lapin dont les références commerciales sont 6B6 fourni par Cell Signaling (Danvers, MA, USA).

Il est utilisé à une dilution de 1/100^e et conservé à -20°C.

Un flacon de 100µL de ce produit coûte 389€.

b) Anticorps L858R :

Il s'agit d'un anticorps monoclonal de lapin dont les références commerciales sont 43B2, fourni par Cell Signaling (Danvers, MA, USA).

Il est utilisé à une dilution 1/100^e et conservé à -20°C.

Un flacon de 100µL de ce produit coûte 389€.

4. Protocoles :

a) Préparation des coupes :

La détection des antigènes est réalisée à partir de blocs de tumeur fixée puis incluse en paraffine. La technique est réalisée sur des coupes épaisses de 3µM, montées à l'eau sur des lames Polysine™ (LABONORD S.A., Templemars, FR), séchées pendant 5 min sur une platine chauffante à 58°C puis placées à l'étuve à 56°C pendant 1 à 2 heures.

b) Prétraitement : déparaffinage et démasquage :

Le déparaffinage et le démasquage des sites antigéniques sont réalisés dans le même temps dans un bain-marie PTLINK™ DAKO en tampon citrate pH 6,0 pendant 20 min.

c) Dilution des anticorps :

Les anticorps primaires concentrés sont dilués dans le diluant EnVision™ FLEX Antibody Diluent (DM 830) soit un tampon Tris, pH 7,2, NaN₃ 15mmol/L et une protéine.

d) Technique Flex+ lapin sur automate Autosteiner Plus Link® Dako :

- rinçage avec une solution saline de tampon Tris contenant du Tween 20, pH 7,6 (±0,1) pendant 5 min
- blocage des peroxydes endogènes avec le réactif EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (SM 801) soit un tampon phosphate contenant du peroxyde d'hydrogène, NaN₃ 15mmol/L et un détergent pendant 5 min
- rinçage pendant 5 min
- incubation avec l'anticorps primaire pendant 1h soit AC E746-A750del ou L858R
- rinçage pendant 5 min

- anticorps secondaire avec EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER) (SM 805) soit une solution tampon contenant une protéine stabilisante et un agent antimicrobien pendant 15 min
- rinçage pendant 5 min
- polymère marqué avec EnVision™ FLEX/HRP (SM802) soit un dextrane couplé à des molécules de peroxydase et à des molécules secondaires de chèvre dirigées contre les immunoglobulines de lapin et de souris dans une solution tamponnée contenant une protéine stabilisante et un agent conservateur pendant 20 min
- rinçage pendant 2 x 5 min
- chromogène substrat avec EnVision™ FLEX Substrate Buffer (SM 803) soit une solution tamponnée diluant une solution contenant du peroxyde d'hydrogène et le chromogène diaminobenzidine (DAB) et un agent conservateur pendant 10 min
- rinçage pendant 5 min
- contre-coloration avec EnVision™ FLEX Hematoxylin (SM 806) soit une solution aqueuse d'hématoxyline pendant 5 min
- rinçage pendant 5 min
- rinçage à l'eau distillée.

e) Montage des lames :

Déshydratation dans des bains successifs d'éthanol 96°, d'éthanol absolu et toluène, pendant 5 minutes chacun.

Montage à l'Eukitt® (LABONORD S.A., Templemars, FR).

5. Témoins négatifs :

La même technique a été réalisée sur des cas non mutés : 10 cas pour l'anticorps E746-A750del et 10 cas pour l'anticorps L858R.

Un témoin négatif est réalisé par omission de l'anticorps primaire, remplacé par une solution tampon.

6. Analyse :

L'interprétation a été faite par 2 observateurs de façon indépendante (pathologistes), dans la même zone de l'image repérée préalablement selon la bonne qualité de la technique.

En cas de discordance, un accord a été trouvé de façon collégiale lors d'une 3^e lecture.

En se basant sur la littérature [40, 49, 60, 61, 89-92], le score est réalisé en fonction de ces critères :

- le pourcentage de cellules tumorales marquées de 0 à 100%,
- l'intensité du marquage membranaire gradée de 0 à 3+ :
 - o 0 : absence de marquage ou marquage faible de moins de 10% des cellules tumorales,
 - o 1+ : marquage membranaire faible de plus de 10% des cellules tumorales,
 - o 2+ : marquage membranaire modéré de plus de 10% des cellules tumorales,
 - o 3+ : marquage membranaire fort de plus de 10% des cellules tumorales.
- Le pourcentage est ensuite multiplié par l'intensité pour aboutir à un score de 0 à 300.

Les scores de 10 à 300 sont considérés comme positifs, c'est-à-dire confirmant la présence de la mutation L858R ou la délétion de l'exon 19.

7. Coût de la technique : 73,64 euros.

V. Evaluation de la richesse tumorale :

1. Sélection des cas :

30 prélèvements ont été sélectionnés au hasard parmi les 981 prélèvements disponibles.

10 d'entre eux correspondent à des biopsies bronchiques, 10 à des ponctions transpariétales et 10 à des pièces opératoires.

2. Evaluation objective :

Une vision d'ensemble au faible grossissement (objectif x5) permet d'évaluer l'hétérogénéité de la répartition des cellules tumorales, à savoir si la densité des cellules tumorales est homogène dans l'ensemble de la zone délimitée, c'est-à-dire sur environ 100 mm².

Dans la majorité des tumeurs, le prélèvement présente une densité identique sur l'ensemble de la zone sélectionnée pour microdissection, il est réalisé un comptage de cellules tumorales sur 1000 cellules au total, réparties dans 3 différentes zones du prélèvement, au fort grossissement (objectif x40).

Pour un cas restreint de tumeurs, la zone sélectionnée présente une densité de cellules tumorales hétérogène (c'est-à-dire qu'il existe des zones de densité élevée de cellules tumorales avec peu de cellules stromales alternant avec des zones de densité faible de cellules tumorales et une quantité importante de cellules stromales). Il est réalisé un comptage de

cellules tumorales sur 1000 cellules dans une zone de densité cellulaire élevée et sur 1000 cellules dans une zone de densité cellulaire faible dans un 2^e temps. Puis il est calculé la moyenne des 2 valeurs.

3. Evaluation subjective :

Ces 30 prélèvements ont été analysés par 4 pathologistes et ceci à 2 reprises, de façon décalée dans le temps.

De façon indépendante, chacun a évalué de façon subjective la richesse tumorale en pourcentage mais également en fonction de 3 seuils : $\leq 15\%$, $15-50\%$ et $\geq 50\%$, puis de 2 seuils $< 50\%$ et $\geq 50\%$.

L'objectif de ce travail est d'étudier la concordance de l'évaluation entre différents observateurs mais également en intra-observateur.

La précision de la richesse tumorale en fonction de ces seuils nous permet d'analyser la concordance des observateurs en fonction de chiffres en rapport avec la sensibilité des techniques [152].

VI. Enquête auprès des cliniciens concernant la prescription d'inhibiteurs de la tyrosine kinase pour les patients présentant une mutation du gène de l'EGFR dans leur tumeur:

Pour les patients présentant une mutation du gène de l'EGFR présumée ITK-sensible, il nous est paru important de connaître le pourcentage de patients qui ont bénéficié d'un traitement par ITK.

Le 2^e but de cette enquête est d'évaluer la réponse au traitement en termes de survie et de qualité de vie. Simultanément il a été collecté les données concernant le statut tabagique, la mise en route ou non de traitements anti-cancéreux préalables (radiothérapie, chimiothérapie, Avastin...) et la tolérance au traitement.

L'efficacité du traitement a été évaluée selon les critères RECIST (196, 179) c'est-à-dire en les classant en patients répondeurs (réponse complète ou partielle) ou en patients non répondeurs (stable ou en progression).

Pour cela, il a été mis en place un questionnaire clinique avec l'aide du Dr Issartel, Président du Collège des Pneumologues de Lorraine, envoyé à chacun des cliniciens concernés. Les résultats m'ont été retournés par courrier, fax ou téléphone.

Nom Prénom Date de naissance du patient (n° cas EGFR) :

Histologie de la tumeur. Statut TTF1.

Statut mutationnel EGFR.

Tabagisme :

Stade TNM initial :

Institution du traitement par ITK ? OUI/NON

Traitements antérieurs :

Si ITK, type, posologie et date d'initiation :

Stade TNM au moment de l'initiation :

Stade de la surveillance (nombre de rendez-vous après le début du traitement) :

Outils de surveillance :

Résultats de la surveillance avec qualité de la réponse (compte-rendus de scanner si besoin) :

Effets secondaires :

Qualité de vie avec score OMS :

Date du décès ou date d'arrêt de la surveillance :

Figure 46: questionnaire envoyé aux cliniciens

VII. Etude statistique :

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Sas 9.3. L'analyse statistique, l'interprétation et la présentation des résultats ont été réalisées avec l'aide de Madame Erpelding Marie-Line, biostatisticienne du Service d'Epidémiologie et d'Evaluation Cliniques du CHU de Nancy.

Les données quantitatives ont été analysées avec le test de Fisher, les tests étant considérés comme significatifs lorsque la valeur de p est inférieure à 5%.

Pour l'étude de la concordance entre observateurs lors de l'évaluation de la richesse tumorale, la méthode s'est basée sur la mesure du Kappa pour déterminer un coefficient de corrélation intraclasse (ICC) selon Landis et Koch.

RESULTATS

I. Mutations au sein de notre population :

1. Résultats de la technique de biologie moléculaire :

Au sein de notre population, la recherche des mutations n'a pas pu être réalisée en raison de l'insuffisance en matériel tumoral dans 56 cas, soit dans 5,7 % des cas.

L'analyse n'a pas été contributive pour l'ensemble des mutations, dans 32 cas soit dans 3,2 % des cas et pour certaines des mutations dans 34 cas également soit dans 3,4 % des cas.

L'analyse non contributive est due à l'absence d'amplification du matériel extrait des échantillons.

2. Taux de mutations :

Sur les 925 échantillons où l'analyse a été réalisée, il a été détecté 82 mutations du gène de l'EGFR, soit 8,8 % de mutations, 225 mutations du gène KRAS soit 24,3 % de mutations et 3 mutations du gène HER2 soit 0,3 % de mutations.

3. Type de mutations du gène de l'EGFR :

a) Exon 18 :

Il a été détecté 2 mutations G719A de l'exon 18 soit 0,21 %.

b) Exon 19 :

Il a été détecté 47 mutations soit 4,98 % par rapport à l'ensemble des cas analysés dont 3 délétions de 9 pb (0,31 %), 1 délétion de 12 pb (0,1 %), 33 délétions de 15 pb (3,5 %), 9 délétions de 18 pb (0,95 %) et 1 délétion de 24 pb (0,1 %).

c) Exon 20 :

Il n'a pas été détecté de mutations de l'exon 20.

d) Exon 21 :

Il a été détecté 33 mutations L858R de l'exon 21 soit 3,5 %.

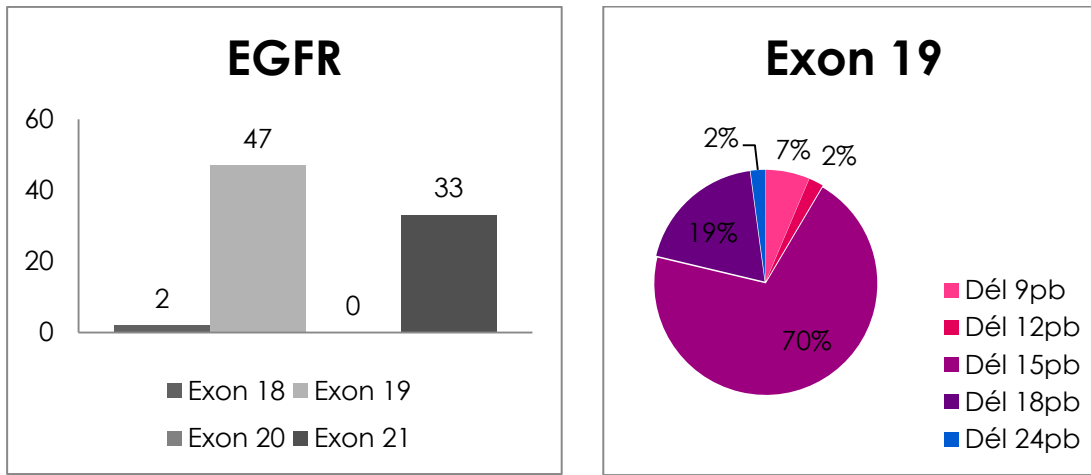


Figure 47 : répartition des mutations du gène de l'EGFR et des différents types de délétion de l'exon 19

4. Type de mutations du gène KRAS :

Sur les 225 mutations détectées, 212 soit 94,2 % ont intéressé une inversion au sein du codon 12 dont 2 cas de double insertion, 12 soit 5,3 % au sein du codon 13 et 1 mutation soit 0,4 % a intéressé une double insertion au sein des 2 codons 12 et 13.

Contrairement au fait que les mutations de KRAS soient mutuellement exclusives de celles de l'EGFR, et conformément aux données de la littérature, il a été mis en évidence une mutation de KRAS au sein du codon 12 en association à une mutation du gène de l'EGFR, soit une délétion de 9 pb au sein de l'exon 19.

5. Type de mutations du gène HER2 :

Les 3 mutations détectées ont concerné 2 insertions de 12 pb et 1 insertion de 9 pb. Ces mutations ne s'associaient pas à une mutation de KRAS ou de l'EGFR.

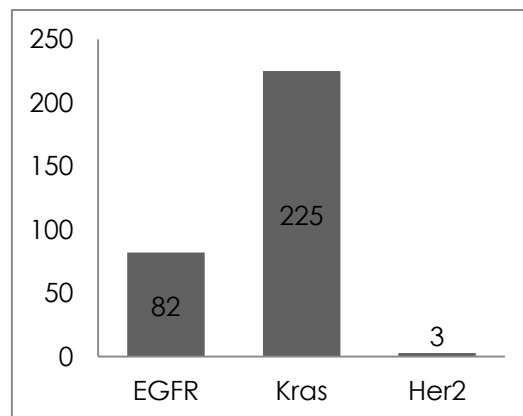


Figure 48 : répartition des mutations d'EGFR, KRAS et HER2 sur les 1000 patients

II. Profil des patients et des tumeurs présentant une mutation de l'EGFR :

1. Clinique :

Les patients présentant une mutation EGFR étaient pour 52 des cas une femme soit 63,4% et 30 hommes soit 36,6%.

La moyenne d'âge de ces patients était de 67 ans, la médiane de 69 ans. En effet les âges s'étalaient de 38 à 85 ans.

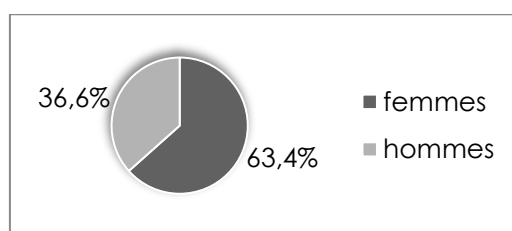


Figure 49 : sexe des patients

Le statut tabagique n'a pas pu être recueilli pour 7 patients. Parmi les 75 patients restants, 34 d'entre eux étaient fumeurs soit 45,3 %, dont 30 fumeurs actifs et 4 fumeurs passifs. La consommation tabagique était en moyenne de 29,8 paquets/année et s'étalait de 9 à 80 paquets/année.

2. Type d'échantillons ayant supporté le diagnostic :

Les 82 échantillons concernaient des exérèses, des prélèvements biopsiques mais également du matériel cytologique.

En effet les échantillons rassemblaient :

- 21 pièces opératoires (lobectomies ou pneumonectomies) (25,6 %), 3 pleurectomies (3,7 %), 2 exérèses atypiques (2,4 %), 1 adénectomie (1,2 %) et 1 exérèse méningée (1,2 %),
- 19 ponctions transpariétales (23,2 %), 18 biopsies bronchiques (22 %), 8 biopsies pleurales (9,8 %), 3 médiastinobiopsies (3,7 %), 2 biopsies osseuses (2,4 %), 1 biopsie ganglionnaire (1,2 %) et 1 biopsie hépatique (1,2 %),
- 1 liquide pleural (1,2 %) et 1 liquide péricardique (1,2 %).

La majorité (93.9%) des prélèvements ont été fixés dans du formol à 10% (v/v) tamponné pH 7,4 (n=77), seuls 3 prélèvements ont été fixés dans de l'AFA (Alcool Formolé Acétique) (3,7 %) et 2 dans du FA (Formol Acétique) (2,4 %).

Ces échantillons ont été acheminés au laboratoire pour recherche des mutations du 16/04/10 au 05/08/11 soit sur toute la période d'inclusion des patients. La 1^{ère} mutation a été détectée 14 jours après le début de la mise en place de la technique.

3. Site du prélèvement :

Les prélèvements ont pu concerner le site tumoral primitif mais également les sites tumoraux secondaires.

En effet ceux-ci concernaient le site primitif pulmonaire dans 59 cas (72 %) et un site métastatique dans 23 cas (28 %).

Les sites métastatiques rassemblaient 12 localisations pleurales (14,6 %), 4 ganglions (4,9 %), 3 métastases osseuses (3,7 %), 1 métastase hépatique (1,2 %), 1 métastase méningée (1,2 %), 1 localisation péricardique (1,2 %) et 1 métastase médiastinale (1,2 %).

4. Tumeur :

a) Histologie :

La totalité des cas présentant une mutation EGFR concernait des adénocarcinomes.

b) Sous-type histologique :

Celui-ci a pu être précisé dans les cas où le matériel acheminé au laboratoire pour recherche des mutations était suffisant et représentatif de la tumeur globale. Il s'agissait donc de prélèvements concernant des pièces opératoires du site primitif ou secondaire.

Il a donc pu être évalué dans 28 cas et correspondait à :

- 19 adénocarcinomes à prédominance acineuse (67,8 %),
- 4 adénocarcinomes à prédominance solide (14,2 %),
- 2 adénocarcinomes à prédominance lépidique (7,1 %),
- 2 adénocarcinomes à prédominance papillaire (7,1 %),
- 1 adénocarcinome à prédominance micropapillaire (3,5 %).

Chez les patients ne présentant pas de mutation EGFR, le sous-type histologique a pu être établi dans 298 cas et il comportait :

- 117 cas d'adénocarcinome à prédominance acineuse (39,2 %),
- 113 cas d'adénocarcinome à prédominance solide (37,9 %),
- 37 cas d'adénocarcinome à prédominance papillaire (12,4 %),
- 14 cas d'adénocarcinome à prédominance lépidique (4,7 %),
- 9 cas d'adénocarcinome à prédominance micropapillaire (3 %),
- 7 cas d'adénocarcinome mucineux (2,3 %),
- 1 cas d'adénocarcinome colloïde (0,3%).

Si l'on compare le taux de sous-type acineux dans les cas mutés et dans les cas non mutés, selon le test de Fisher, la différence n'est pas significative avec une valeur p (p-value) à 0,09 (Odds Ratio : 0,5794 Intervalle de confiance à 95% [0,299 ; 1,1433]).

c) Statut TTF1 en immunohistochimie :

76 tumeurs exprimaient l'antigène TTF1 en immunohistochimie soit 92,7 % contre 6 ne l'exprimant pas (7,3 %).

d) Stade clinique :

Celui-ci était connu dans 76 cas. La majorité des tumeurs était des tumeurs de stade avancé avec 53 tumeurs de stade IIIA, IIIB ou IV (69,7 %) au moment du diagnostic de CBNPC.

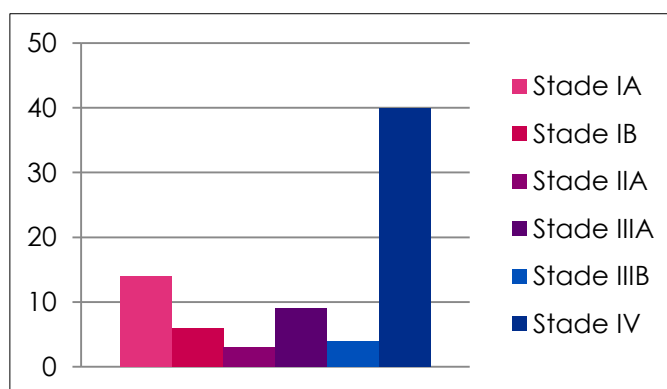


Figure 50 : répartition des stades cliniques

e) Tumeur métastatique :

Au moment du diagnostic, 51 patients étaient déjà métastatiques au niveau ganglionnaire, au niveau pulmonaire, pleural ou péricardique ou au niveau extrathoracique (62,2 %).

Les patients pouvaient présenter 1 métastase mais également plusieurs à différents sites.

Les sites pouvaient être :

- ganglionnaire (33 cas soit 64,7 %),
- pleural (13 cas soit 25,5 %),
- cérébral (7 cas soit 13,7 %),
- osseux (6 cas soit 11,8 %),
- hépatique (3 cas soit 5,9 %),
- surrénalien (2 cas soit 3,4 %),
- péricardique (1 cas soit 1,2 %),
- pancréatique (1 cas soit 1,2 %).

f) Richesse tumorale :

Lors de l'étape préanalytique, l'ensemble de ces prélèvements ont été évalués du point de vue de leur richesse tumorale notamment dans la région d'intérêt.

La richesse de ces 82 échantillons s'étalait de 10 à 100 %, la moyenne étant de 50 %, la médiane de 60 % et l'écart-type de 30 %.

III. Place de l'immunohistochimie (IHC) dans la détection des mutations du gène de l'EGFR:

1. Résultats de l'IHC :

Cette technique a pu être testée sur 70 cas parmi les 82 cas mutés. Dans 2 cas, elle n'a pas été réalisée car il s'agissait d'une mutation de l'exon 18. Dans les 10 cas restants, le matériel acheminé au laboratoire et restant après réalisation de copeaux pour la biologie moléculaire, était insuffisant.

Grâce à la technique d'immunohistochimie utilisée au service, il a été observé un marquage membranaire plus ou moins intense par les deux anticorps utilisés E746-A750del et L858R.

a) Anticorps E746-A750del :

Celui-ci a été testé sur 43 cas.

Pour 19 cas, il existait une intensité de marquage 0 c'est-à-dire l'absence de marquage ou sur moins de 10 % des cellules (voir figure 51A).

Pour 10 cas, il existait une intensité de marquage 1 c'est-à-dire un marquage membranaire faible de plus de 10% des cellules tumorales (voir figure 51B).

Pour 5 cas, il existait une intensité de marquage 2 c'est-à-dire un marquage membranaire modéré de plus de 10% des cellules tumorales (voir figure 51C).

Pour 9 cas, il existait une intensité de marquage 3 c'est-à-dire marquage membranaire fort de plus de 10% des cellules tumorales (voir figure 51D).

En tenant compte du score, 24 cas sur les 43 cas avec mutation de l'exon 19 présentaient un score de 10 à 270 et étaient considérés comme positifs, soit une sensibilité pour l'exon 19 de 55,8 %.

Sur les 3 cas de délétion de 9 pb, l'immunohistochimie était négative avec des scores à 0, soit une sensibilité nulle.

Il en est de même pour les 2 cas de délétion de 12 et 24 pb avec un score nul.

Sur les 9 cas de délétion de 18 pb, il existe 1 seul cas positif avec un score à 40, soit une sensibilité de 11,1 %.

Pour la délétion de 15 pb, l'immunohistochimie a pu être réalisée dans 29 cas et elle s'est avérée positive dans 23 cas, soit une sensibilité de la délétion de 15 pb, de 79,3 %.

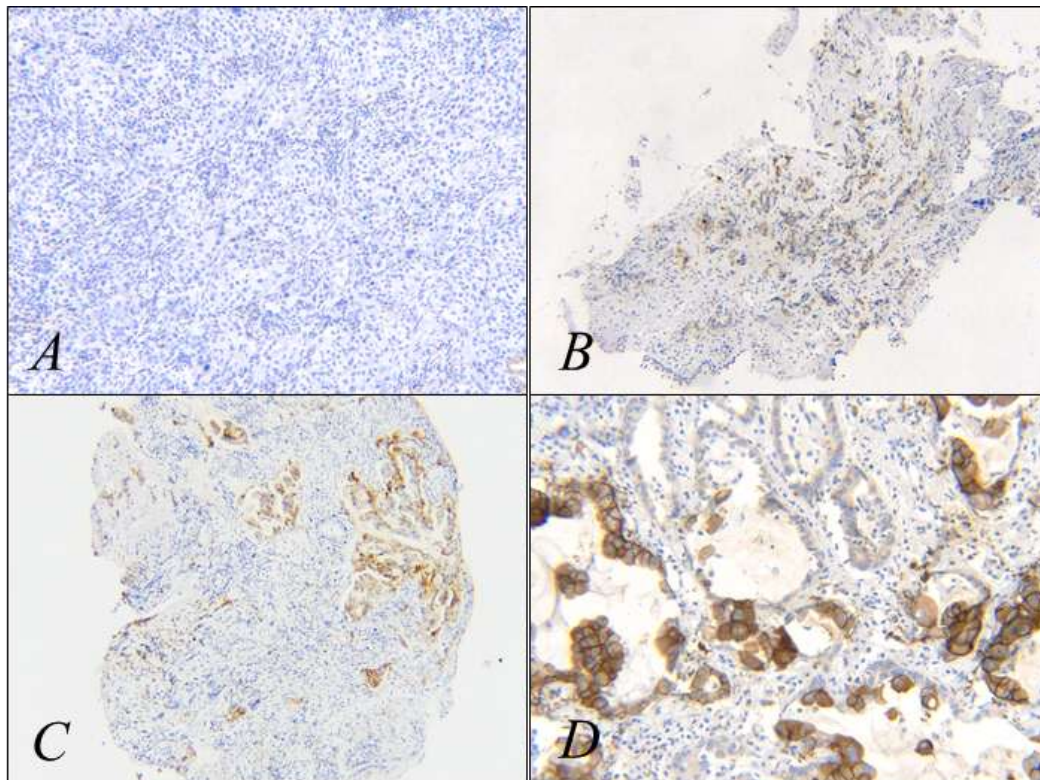


Figure 51 : immunohistochimie avec l'anticorps A746-A750del. A: score 0 ; B: score 1 ; C: score 2 ; D: score 3

b) Anticorps L858R :

Celui-ci a pu être testé sur 27 cas.

Il a été mis en évidence 9 cas d'intensité de marquage 0 (voir figure 52A), 9 cas d'intensité de marquage 1, 4 cas d'intensité de marquage 2 et 5 cas d'intensité de marquage 3 (voir figure 52B).

En termes de score, 18 cas étaient positifs avec des scores de 20 à 285, soit une sensibilité pour la mutation de l'exon 21 de 66,6 %.

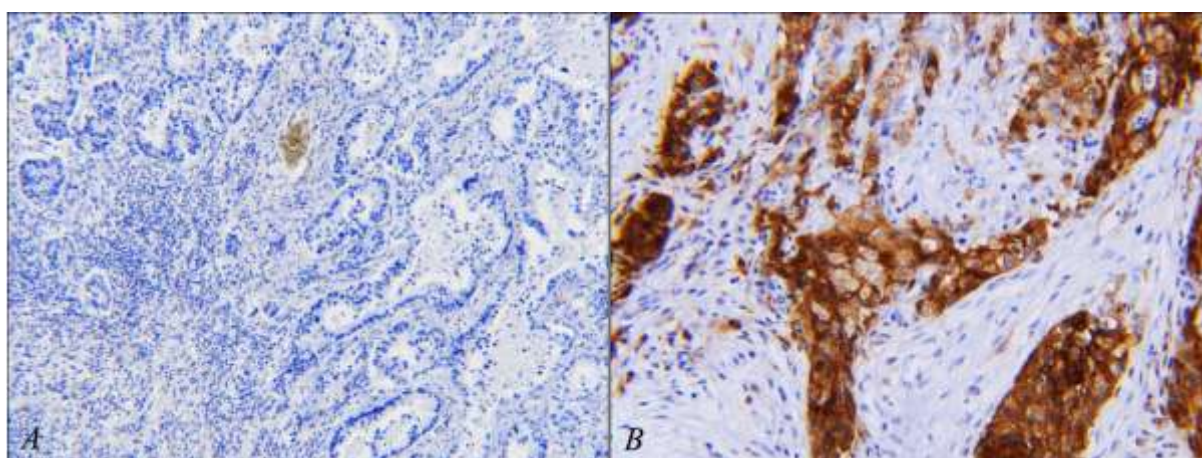


Figure 52: immunohistochimie avec l'anticorps L858R. A : score 0 ; B : score 3

2. Sensibilité globale :

Sensibilité du test = fréquence à laquelle le test est positif chez les sujets malades
 $= 42 / (42+28) = 60\%$

3. Sensibilité du test selon le type de mutation :

a) Exon 19 :

Parmi les 47 sujets malades avec une mutation exon 19, 43 ont eu un test.

Sensibilité = fréquence à laquelle le test est positif chez les sujets malades avec une mutation exon 19 = $24 / (24+19) = 55,8\%$.

b) Exon 21 :

Parmi les 33 sujets malades avec une mutation exon 21, 27 ont eu un test.

Sensibilité = fréquence avec laquelle le test est positif chez les sujets malades avec une mutation exon 21 = $18 / (18+9) = 66,7\%$.

4. Spécificité :

Les deux anticorps ont été testés sur 20 cas de tumeur ne présentant pas de mutation.

L'immunohistochimie était négative dans tous les cas avec des scores nuls.

La spécificité est donc de 100 %.

5. Coût de la technique :

a) Biologie moléculaire :

Pour chaque tumeur analysée pour une recherche de mutation du gène de l'EGFR, le coût de la technique est de 397,60 euros en moyenne. Pour les 1000 patients, le coût de l'analyse s'est élevé à 374 539,2 euros.

b) IHC :

Le coût de l'IHC est de 36,82 euros.

Tous les cas négatifs auraient dans ce cas, dû être analysés par biologie moléculaire.

Dans cette étude, le statut mutationnel est connu pour les 82 patients. Or, si cette technique avait été adoptée au départ, avant la réalisation de la biologie moléculaire, il aurait été

indispensable de réaliser la technique avec chaque anticorps, soit un coût total pour chaque cas de 73,64 euros.

Selon la procédure IHC préalable imaginée par certains auteurs, le coût global du protocole en utilisant IHC et biologie moléculaire s'élève à 427 208,88 euros. Sachant que tous les cas négatifs sont analysés par biologie moléculaire.

Il existe donc une différence de 52 669,68 euros pour une population de 1000 patients ce qui équivaut à une augmentation de 7 % du prix par rapport à celui du protocole utilisant uniquement la biologie moléculaire.

IV. Intérêt de l'évaluation de la richesse tumorale lors de la phase préanalytique par les pathologistes :

1. Analyse statistique des résultats :

La méthode s'est basée sur la mesure du Kappa pour déterminer un coefficient de corrélation intraclass (ICC) selon Landis et Koch [153]. En fait les résultats sont significatifs lorsque le Kappa est supérieur à 0,80.

| Kappa | Concordance inter-observateur |
|--------------|--------------------------------------|
| < 0 | Médiocre |
| 0,00 – 0,20 | Minime |
| 0,21 – 0,40 | Passable |
| 0,41 – 0,60 | Modérée |
| 0,61 – 0,80 | Appréciable |
| 0,81 – 1,00 | Parfaite |

Tableau 5: signification des Kappa dans l'analyse de la concordance inter-observatrice

2. Concordance de la méthode subjective absolue en % entre 4 lecteurs :

L'ICC est de 0,4349.

Selon Landis et Koch, ce résultat est modéré.

3. Concordance entre la méthode objective et la méthode subjective absolue pour chaque lecteur :

L'ICC varie de 0,3416 à 0,6356.

2 des 4 lecteurs ont un ICC correspondant à une concordance appréciable. 1 lecteur a un ICC correspondant à une concordance passable.

4. Concordance de la méthode subjective semi-quantitative avec 3 seuils entre 4 lecteurs :

En utilisant les 3 seuils, le coefficient kappa est de 0,31 ce qui reste passable.

5. Concordance entre la méthode objective et la méthode subjective semi-quantitative avec 3 seuils pour chaque lecteur :

Pour les 4 lecteurs, le coefficient pondéré kappa varie de 0,21 à 0,66. 1 lecteur possède une concordance passable, 2 une concordance modérée et 1 lecteur une concordance appréciable.

6. Concordance de la méthode subjective semi-quantitative avec 2 seuils entre 4 lecteurs :

Pour les 4 lecteurs, le coefficient pondéré kappa est de 0,39 ce qui équivaut à une concordance passable.

7. Concordance entre la méthode objective et la méthode subjective semi-quantitative avec 2 seuils pour chaque lecteur:

Pour les 4 lecteurs, le coefficient pondéré kappa varie de 0,2795 à 0,6725. 1 lecteur possède une concordance passable, 2 une concordance modérée et 1 lecteur une concordance appréciable.

8. Concordance intra-observateurs de la méthode subjective pour chaque lecteur :

L'ICC varie de 0,3898 à 0,7396. 3 des 4 lecteurs ont une concordance appréciable et 1 lecteur une concordance passable.

V. Résultats de l'enquête auprès des cliniciens sur l'indication des Inhibiteurs de la Tyrosine Kinase (ITK) :

1. Instauration du traitement par ITK :

Il est très important de préciser que toutes les informations ont été obtenues à des temps différents selon la rapidité de réponse des cliniciens, mais également à des temps différents de l'histoire clinique des patients. Ces informations ne sont qu'un état des lieux à titre indicatif. Les renseignements ont pu être obtenus pour 74 patients. Les 8 patients restants ont été perdus de vue (suivis ailleurs ou décédés).

Le traitement a été instauré chez 41 patients soit 55,4 %.

Les raisons de non-instauration du traitement chez les patients présentant une mutation sont multiples mais concernent en fait 3 catégories : les décès, les hors-indications et les patients stables après la chirurgie ou une 1^{ère} ligne de traitement.

Sur les 33 patients présentant une mutation mais n'ayant pas fait l'objet d'une prescription d'ITK, étant décédés peu après le diagnostic, 4 patients soit 12,1 % n'ont pas eu le temps de bénéficier du traitement.

27 patients soit 81,8 % ne remplissaient pas les critères d'indication du traitement, qui sont pour rappel, une tumeur localement avancée ou métastatique (stades III et IV). Certains patients ne relevaient pas d'une indication de par l'état trop avancé de leur maladie, ne nécessitant qu'un traitement palliatif ou de par leurs antécédents (maladie d'Alzheimer). 2 patients soit 6 % étaient stables et la décision de l'instauration d'un traitement par ITK n'a pas été prise.

2. Molécule prescrite :

31 patients soit 75,6 % ont bénéficié d'un traitement par gefitinib et 10 patients soit 24,4 % par erlotinib, aux doses recommandées par la Haute Autorité de Santé.

3. Stade clinique à l'instauration du traitement :

Le stade était connu pour 39 patients sous ITK. 5 patients soit 12,8 % présentaient un stade IIIA, 3 patients soit 7,7 % un stade IIIB et 31 patients soit 79,5 % un stade IV.

4. Traitements antérieurs éventuels :

13 patients soit 31,7 % ont bénéficié du traitement par ITK en 1^{ère} ligne de traitement.

28 patients soit 68,3 % ont bénéficié du traitement en 2^{ème} ligne. Le traitement antérieur était dans 66,6 % des cas une chimiothérapie, dans 11,1 % des cas une radiothérapie, dans 14,8 % des cas une radio-chimiothérapie avec pour 7,4 % des cas un talcage pleural.

5. Modalités de surveillance du traitement :

Les modalités de surveillance étaient assez variables entre les cliniciens, la fréquence de réévaluation du traitement variant de 3 à 6 mois selon l'état clinique du patient.

L'outil de surveillance était invariablement le scanner, seul ou associé à une autre technique d'imagerie comme la radiographie thoracique, l'IRM, le TEP ou l'échographie abdominale.

6. Effets secondaires du traitement par ITK :

Des effets secondaires ont été signalés chez 17 patients et concernaient :

- des troubles digestifs (diarrhées, nausées) dans 5 cas,
- des signes cutanés (prurit, xérostomie, sécheresse, acné, fissures) dans 11 cas,
- des signes généraux (asthénie) dans 2 cas sans pouvoir affirmer avec certitude leur imputabilité au traitement,
- 1 cas de cytolysé hépatique,
- 1 cas d'insuffisance rénale aigue.

7. Estimation de l'efficacité du traitement par ITK :

Là encore, il est très important de souligner qu'il s'agit d'une estimation première, la mesure de la réelle efficacité nécessitant un recul plus important et un nombre de patients plus conséquent.

Sur les 41 patients sous ITK, la réponse tumorale au traitement s'est basée sur les critères RECIST [154].

Pour rappel, ceux-ci ont été adaptés du manuel original de l'OMS [155], en tenant compte seulement des mesures des plus grands diamètres de chaque lésion cible.

Dans un premier temps, nous définirons les critères utilisés pour déterminer objectivement la réponse tumorale sur les lésions cibles. On distingue successivement :

- la réponse complète : disparition de toutes les lésions cibles,
- la réponse partielle : diminution d'au moins 30 % de la somme des plus grands diamètres de chaque lésion cible, en prenant pour référence la somme initiale des plus grands diamètres,
- la progression tumorale : augmentation d'au moins 20 % de la somme des plus grands diamètres de chaque lésion cible, en prenant pour référence la plus petite somme des plus grands diamètres, rapportée depuis le début du traitement, ou apparition de une ou de plusieurs nouvelles lésions,
- la stabilité tumorale : diminution tumorale insuffisante pour définir une réponse partielle et/ou augmentation tumorale inférieure à celle nécessaire pour définir une progression tumorale, en prenant pour référence la plus petite somme des plus grands diamètres depuis le début du traitement.

Dans un second temps, nous définirons les critères utilisés pour déterminer objectivement la réponse tumorale sur les autres lésions. On distingue :

- la réponse complète : disparition de toutes les autres lésions et normalisation des marqueurs tumoraux,
- la réponse incomplète/stabilité tumorale : persistance de une ou de plusieurs autres lésions et/ou persistance de la valeur du marqueur tumoral au-dessus des valeurs normales,
- la progression tumorale : apparition d'une ou de plusieurs nouvelles lésions et/ou progression franche des autres lésions existantes (une progression tumorale franche exclusivement sur les autres lésions est exceptionnelle. L'avis du médecin responsable du patient doit donc prévaloir dans ces circonstances et la progression tumorale doit être ultérieurement confirmée par un panel d'experts).

La meilleure réponse globale se définit comme la meilleure réponse tumorale rapportée depuis le début du traitement jusqu'à progression/récidive/rechute de la maladie (en prenant pour référence, pour définir une progression tumorale, la plus petite mesure rapportée depuis le début du traitement). Seules les réponses décrites et confirmées après au moins 4 semaines

seront prises en compte pour définir la meilleure réponse globale. Le tableau ci-dessous donne toutes les possibilités de réponse globale en tenant compte de toutes les combinaisons possibles de réponses tumorales sur les lésions cibles et les autres lésions.

| Lésions cibles | Autres lésions | Nouvelles lésions | Réponses globales |
|----------------|----------------------|-------------------|-------------------|
| RC | RC | Non | RC |
| RC | Réponse incomplète/S | Non | RP |
| RP | Non-P | Non | RP |
| S | Non-P | Non | S |
| P | Toute réponse | Oui ou non | P |
| Toute réponse | P | Oui ou non | P |
| Toute réponse | Toute réponse | Oui | P |

Tableau 6: réponse tumorale globale (incluant toutes les combinaisons possibles de réponses tumorales sur les " lésions cibles " et les "autres lésions ") (RC=réponse complète; RP=réponse partielle; S=stabilité tumorale; Non-P=non progression; P=progression tumorale)

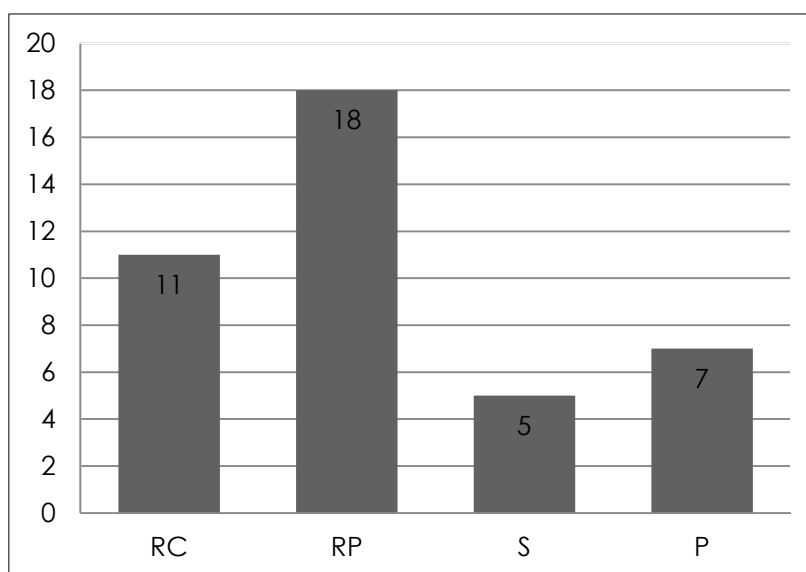


Figure 53: réponse tumorale des 41 patients sous ITK

Il a été établi que les patients répondeurs étaient considérés comme ceux présentant une réponse complète ou partielle et ceux qui ne répondaient pas ceux qui présentaient une stabilité de la réponse ou une progression.

Dans notre population de 41 patients sous ITK, le nombre de répondeurs était de 29 soit 70,7%.

Parmi les patients répondeurs, le recul était suffisant pour assister à une résistance au traitement. En effet 6 patients présentant dans un 1^{er} temps une réponse complète, ont progressé et 6 patients avec une 1^{ère} réponse partielle après une phase de stabilisation ont progressé sous traitement.

Le délai moyen d'apparition d'une résistance est de 6 mois pour ces patients répondeurs.

Au moment de l'enquête, parmi les patients sous ITK, 23 patients étaient en cours de surveillance, 17 étaient décédés et 1 patient était perdu de vue (suivi en Italie).

Le délai moyen de décès par rapport au début de l'instauration du traitement est de 13 mois.

DISCUSSION

I. Les mutations du gène de l'EGFR et des autres biomarqueurs en Lorraine :

1. Efficacité de la technique de biologie moléculaire :

Sur 1000 cas, l'analyse des résultats non interprétables montre que dans 5,7 % des cas, le matériel tumoral est insuffisant en valeur absolue (soit quelques dizaines de cellules par plans de coupe) ou relative (cellules tumorales distribuées dans un stroma abondant et ne se prêtant pas à une macro- et microdissection). De ce fait le pourcentage de cellules tumorales est inférieur au seuil de détection des techniques utilisées dans la plateforme. Cette fréquence de prélèvements non interprétables est conforme à la moyenne nationale (5,3 % des cas pour la moyenne nationale enregistrée par l'INCa) [156]. Il est à noter que nous analysons tous les échantillons qui nous sont confiés même si la quantité de cellules tumorales est extrêmement limitée (quelques dizaines de cellules). Ce problème pourrait être résolu par une meilleure exploitation du matériel tumoral par le pathologiste lors de l'envoi à la plateforme même si dans la majorité des cas, le prélèvement en lui-même est limité en taille. En effet si l'on prend l'exemple d'une biopsie bronchique, celle-ci doit dans un premier temps être analysée pour réaliser un diagnostic, nécessitant parfois plusieurs niveaux de coupes pour la réalisation d'HES, l'étude immunohistochimique (TTF1, p40, ALK) et éventuellement FISH (ALK). Aux termes de ces études, le matériel tumoral résiduel peut être limité.

Dans 3,4 % des cas, l'ADN s'est avéré impossible à amplifier, ce qui est identique aux chiffres nationaux [156]. La raison de cette non-amplification est souvent due à un problème de fixation du prélèvement au départ de la prise en charge. Il faut rappeler que nos 1000 prélèvements proviennent de nombreux laboratoires qui procèdent de façon diverse, surtout quant à la durée de fixation, et moins par le choix du fixateur utilisé. Le temps de fixation n'a pas pu être comparé mais le type de fixateur nous a été transmis. L'ensemble des cas non amplifiés correspond à des prélèvements fixés au formol 10% (v/v) tamponné pH 7,4, fixateur le plus couramment utilisé. Donc le problème prend vraisemblablement sa source dans la fixation trop courte qui va faciliter une lyse cellulaire. Une uniformisation des techniques s'avérera à terme incontournable.

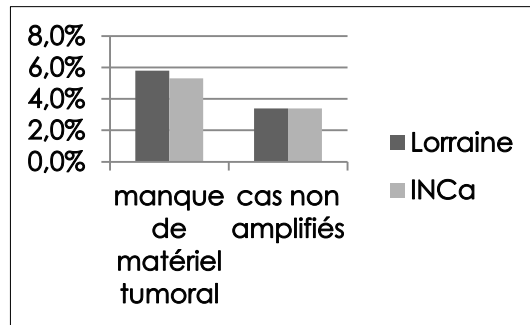


Figure 54 : comparaison de l'efficacité de la technique entre la Lorraine et les chiffres nationaux [156]

2. Fréquence des mutations :

a) EGFR :

En France, le taux de mutations identifiées est de 10,5 % en 2010 (11,7 % en 2009) et est très variable d'un laboratoire à l'autre [6,9 % ; 20,6 %] [156]. Ces variations tiennent en grande partie de la sélection des populations analysées. Le résultat de 8,8 % de mutations du gène de l'EGFR sur la plateforme de Nancy correspond tout à fait aux résultats attendus.

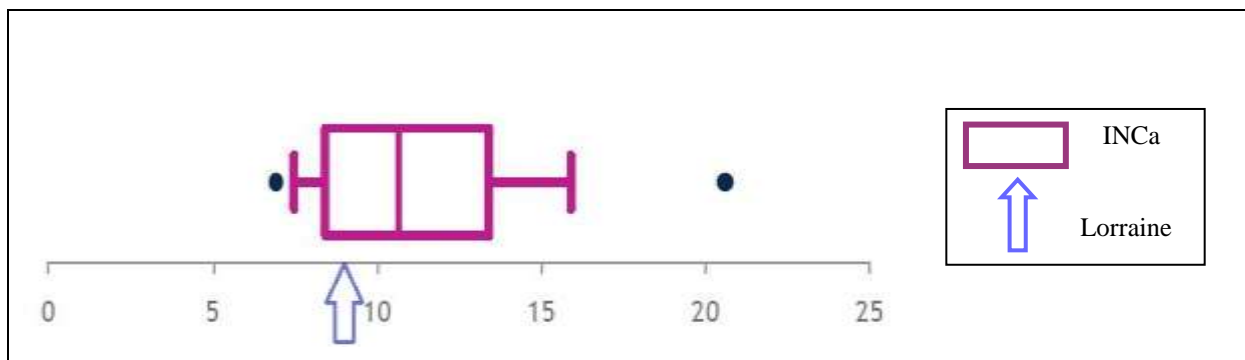


Figure 55: comparaison de la fréquence des mutations EGFR en Lorraine par rapport aux chiffres nationaux

b) KRAS :

Selon les données de l'INCa en 2010, le taux de mutations du gène *KRAS* est de 23,6 % et varie de 0 % (0/2 patients) à 56 % (37/66) selon les laboratoires. Il est comparable aux observations de 2009 (21,7 % de mutations) [156]. En Lorraine il a été détecté 23,9 % de mutations du gène de *KRAS* ce qui est conforme aux résultats attendus.

c) HER2 :

Dans les données de la littérature, la fréquence des mutations est de 3 % [52]. Il n'a été détecté que 0,3 % de mutations du gène de HER2 mais devant des fréquences aussi faibles, il faut prendre en compte l'insuffisance du recul.

3. Répartition des mutations de l'EGFR :

En 2010, selon les données de l'INCa, 55 % des mutations identifiées sont localisées sur l'exon 19 du gène, et 32 % sont sur l'exon 21. Les mutations de l'exon 20 et de l'exon 18 représentent respectivement 9 % et 4 % des mutations identifiées [157].

En Lorraine, parmi les 82 mutations de l'EGFR détectées, la mutation de l'exon 19 est la plus fréquente représentant 57,3 % des cas et notamment la délétion de 15 pb dans 42,4 % des cas. Ensuite les mutations de l'exon 21 représentent 40,2 % des cas. Les mutations de l'exon 20 et de l'exon 18 représentent respectivement 0 % et 2,4 % des mutations identifiées. Par rapport au reste de la France, les mutations des exons 19 et 21 sont encore plus importantes et les mutations des exons 18 et 20 sont plus faibles.

Finalement la fréquence et la répartition des mutations de l'EGFR et autres biomarqueurs sont largement comparables aux données de la littérature et plus précisément aux données nationales pour la même période.

II. Profil des patients présentant une mutation de l'EGFR :

Les patients pour lesquels il a été détecté une mutation en Lorraine sont tout à fait semblables à ceux du reste de la France. En effet il s'agit d'une majorité de femmes, avec une petite majorité de non-fumeuses, atteintes d'un adénocarcinome. Le sous-type histologique est majoritairement acineux mais il s'agit du sous-type histologique le plus fréquent d'adénocarcinome.

III. Biologie moléculaire *versus* immunohistochimie :

Selon les données de la littérature, la biologie moléculaire est la technique de référence.

Dans notre population, l'analyse a été efficace dès le début de la technique, sur différents types de prélèvement, incluant la cytologie. Les prélèvements pour lesquels l'analyse a été possible présentaient une richesse tumorale de 10 à 100 % ce qui confirme là encore la très bonne sensibilité des techniques.

Les données sur la fréquence et la répartition des mutations de l'EGFR et autres biomarqueurs sont comparables à ceux des autres plateformes françaises, confirmant la maîtrise de cette technique recommandée.

Même si la bibliographie ne laissait aucune équivoque sur l'impossibilité d'adopter l'immunohistochimie comme technique de routine pour la recherche de ces mutations, il est intéressant d'observer la sensibilité de la technique mais aussi le coût de la recherche des mutations.

En termes de sensibilité, il est évident que cette technique ne peut être bien sensible. En effet même si les mutations des exons 19 et 21 concernent dans notre série 97,5 % des mutations, il reste tout de même 2,5 % de mutations qui ne seraient jamais mises en évidence puisqu'il n'existe pas d'anticorps spécifiques de ces mutations. De plus, pour l'exon 19, il ne faut tenir compte que de la délétion de 15 pb, puisque celle-ci est détectée par l'anticorps E746-A750del. Ceci aboutit donc au chiffre idéal de 82,6 % de mutations qui seraient susceptibles d'être mises en évidence en immunohistochimie, donc une sensibilité idéale de 82,6 %.

Malheureusement ce chiffre n'est jamais atteint puisque cette technique présente certaines limites. En effet il s'agit d'une technique subjective, semi-quantitative et opérateur-dépendant.

Même si de nos jours, la majorité de la technique est automatisée, elle conserve certaines étapes réalisées par la main du technicien. Dans la configuration de la plupart des laboratoires, il s'agit rarement de la même personne donc il peut y avoir une certaine variabilité inter-opérateur.

De plus, le résultat de la technique est analysé par l'œil du pathologiste avec sa part obligatoire de subjectivité. Il est donné sous forme d'un score dont la définition peut varier entre laboratoires. D'ailleurs le cut-off de positivité du test n'a pas été défini de façon standardisée.

Tous ces inconvénients expliquent en partie une faible sensibilité évaluée dans notre cas à 60%.

Avec ces 2 anticorps utilisés, le coût de la recherche des mutations est augmenté par rapport à la technique de référence.

Au vue du coût des techniques de recherche et des traitements mais aussi de l'absence d'efficacité du traitement chez les patients atteints de tumeurs sans mutations, il est indispensable de bien sélectionner les patients grâce à une technique efficace et sensible. Au cours de l'année 2011, l'INCa a démontré que sur environ 20 000 patients bénéficiant du test EGFR en France, le traitement par ITK chez les seuls patients atteints d'un adénocarcinome présentant la mutation, permettait d'économiser 69 millions d'euros. [18].

Une autre limite de cette technique est l'impossibilité de s'intéresser aux biomarqueurs émergents, EML4-ALK excepté, qui représenteront certainement dans l'avenir, des voies pour d'autres thérapeutiques privilégiées.

Si dans l'avenir, l'immunohistochimie devait faire partie des techniques de routine, il faudrait alors bénéficier d'anticorps spécifiques de l'ensemble des mutations déjà découvertes mais peut-être aussi à découvrir dans le futur. La technique devrait être uniformisée au niveau de la technique et de l'analyse. Malheureusement le coût resterait encore très élevé et la durée de la technique serait allongée.

Actuellement l'immunohistochimie n'a pas sa place dans l'évaluation du statut mutationnel EGFR.

IV. Problématique de l'évaluation de la richesse tumorale :

En comparant l'analyse subjective avec une analyse objective, l'analyse subjective chez le même observateur dans le temps et entre différents observateurs, il est évident que la concordance est médiocre si cette évaluation se fait de manière absolue. Elle l'est tout autant en utilisant 3 seuils.

| | Méthode objective | Lecteur 1 à t2 | Lecteur 2 à t2 | Lecteur 3 à t2 | Lecteur 4 à t2 |
|----------------|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Lecteur 1 à t1 | 0,51 | 0,63 | | | |
| Lecteur 2 à t1 | 0,60 | | 0,72 | | |
| Lecteur 3 à t1 | 0,34 | | | 0,38 | |
| Lecteur 4 à t1 | 0,63 | | | | 0,73 |

Tableau 7 : concordance de la méthode subjective en % par rapport à la méthode objective et concordance intra-observatrice dans le temps *** = kappa 0,20 – 0,39 ; ***= kappa 0,40 – 0,59 ; ***= kappa 0,60 – 0,79 ; ***= kappa > 0,80.

| Concordance inter-observateurs en % | Concordance inter-observateurs avec 3 seuils | Concordance inter-observateurs avec 2 seuils |
|-------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 0,43 | 0,31 | 0,39 |

Tableau 8: concordance entre les observateurs avec un pourcentage, avec 3 seuils et avec 2 seuils *** = kappa

0,20 – 0,39 ; ***= kappa 0,40 – 0,59 ; ***= kappa 0,60 – 0,79 ; ***= kappa > 0,80.

L'évaluation subjective reste quelque chose de peu fiable en matière de reproductibilité dans le temps et entre opérateurs.

Pourtant cette évaluation semble indispensable à la prise en charge des prélèvements au niveau de l'étape préanalytique puisque les techniques actuelles ont une très bonne sensibilité pour des prélèvements avec plus de 10 % de cellules tumorales.

Il serait donc judicieux de préciser à cette étape si le prélèvement contient uniquement plus de 10 % de cellules tumorales en sélectionnant la zone la plus riche en tumeur et la plus pauvre en nécrose.

Ainsi lors de l'étape préanalytique, il est indispensable de sélectionner le bloc le plus représentatif de la tumeur, ayant été pris en charge dans les meilleures conditions de fixation et de sélectionner la zone la plus richement tumorale. En effet ce sont tous ces différents critères qui pourraient limiter la réalisation de la recherche de mutations.

V. Les inhibiteurs de la tyrosine kinase chez ces patients :

Dans cette population, il était intéressant de voir comment ces agents anti-cancéreux sont prescrits. Dans la majorité des cas, les ITK ont été prescrits après le résultat du statut mutationnel. Les indications étaient toujours respectées et il s'agit majoritairement du gefitinib en 2^e ligne. Conformément aux données de la littérature, les effets secondaires sont peu fréquents et de gravité minime. Ainsi la manipulation de ces ITK est conforme aux données de la littérature et aux recommandations de l'HAS.

Pour ce qui est de l'évaluation de l'efficacité, notre enquête ne fournit qu'un premier aperçu. En effet, le traitement n'a pas été évalué au même moment par rapport à la date de son instauration pour chaque patient puisque le questionnaire avait été envoyé au même moment alors que le traitement n'avait pas été instauré en même temps. L'homogénéisation des temps de surveillance et surtout un recul plus important nous font grandement défauts.

Pourtant force est de constater que le nombre de répondeurs au traitement est relativement important avec 70 % de patients répondeurs.

Selon les résultats d'une étude publiée en juin 2010, le gefitinib a un meilleur taux de réponse par rapport au traitement par chimiothérapie seule dans le cancer du poumon non à petites cellules avec mutation de l'*EGFR* (73,7 % *versus* 30,7 %, $p < 0,001$) et multiplie également par deux la survie médiane sans progression (10,8 mois *versus* 5,4 mois ; $p < 0,001$) [157].

Dans notre série, les patients ayant répondu dans un premier temps au traitement, ont progressé pour certains, en 7,25 mois en moyenne.

D'ailleurs l'Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique (IFCT) avec le soutien de l'INCa vient d'ouvrir une étude prospective nationale multicentrique s'intitulant « Observatoire national des patients porteurs d'un cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) bénéficiant d'un test moléculaire sur les plateformes hospitalières de génétique Moléculaire ». L'objectif de l'étude BIOMARQUEURS France est de décrire les caractéristiques cliniques et moléculaires de ces tumeurs et de connaître l'impact de ces analyses sur la prise en charge des patients (individualisation des traitements) dans le but d'adapter dans le futur les stratégies thérapeutiques (quels biomarqueurs ? quelle organisation ? quelles orientations thérapeutiques ?).

Cette étude devrait à terme contribuer à l'amélioration de la prise en charge médicale et des résultats thérapeutiques des patients atteints de CBNPC, mais également valoriser dès la fin 2012 l'investissement consenti par les pouvoirs publics pour la réalisation de ces analyses moléculaires à l'échelle nationale.

Cette étude durera 1 an, de janvier à décembre 2012 et permettra d'inclure au moins 17 000 patients si l'on se base sur les chiffres de l'INCa des années 2010 [156]. L'enquête se fera de manière homogène pour chaque patient avec une évaluation à 3 et 12 mois.

Ce sera certainement un moyen plus rigoureux pour évaluer l'efficacité de ce traitement.

CONCLUSION

Cette étude rétrospective portant sur les patients lorrains permet d'affirmer que cette population, atteinte d'adénocarcinomes, présente les mêmes profils mutationnels que celle du reste de la France.

Grâce au Plan Cancer 2009-2012 et au soutien de l'INCa, la recherche des mutations s'est élargie aux biomarqueurs émergents tels que KRAS, PI3K, HER2 et EML4-ALK. Les techniques de référence sont fiables et de plus en plus sensibles.

Le traitement par inhibiteurs de la tyrosine kinase a déjà montré ses preuves dans des études récentes mais grâce à un recul plus important, son efficacité pourra être mieux précisée. Aucune mutation de résistance n'a été détectée en Lorraine mais là encore, un recul sur le traitement est nécessaire pour envisager l'apparition de résistance secondaire.

Des thérapeutiques sont déjà proposées aux patients présentant des transcrits de fusion EML4-ALK (crizotinib), d'autres sont à l'essai pour les patients dont les tumeurs présentent des mutations KRAS ou des amplifications du gène MET. On peut considérer qu'actuellement 12-13% des patients atteints d'adénocarcinomes bronchiques peuvent bénéficier d'une thérapie ciblée.

BIBLIOGRAPHIE

1. Moro-Sibilot, D., *Tumeurs du poumon, primitives et secondaires*. 2010.
2. Inserm, I., *Dynamique d'évolution des taux de mortalité dans les principaux cancers en France*. Plan Cancer, 2010.
3. INVS, F.H.c.d.L.I.I., *Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2010*. 2011.
4. Brambilla, E., [Responses to targeted therapies: lung cancer]. *Ann Pathol*, 2009. **29 Spec No 1**: p. S77-80.
5. Flieder, D., *Common Non-Small-Cell Carcinomas and Their Variants*, in *Pulmonary Pathology*, M. Springer, Editor. 2008.
6. INSERM. <http://www.inserm.fr/thematiques/cancer/dossiers/cancer-du-poumon>. 2012.
7. INCa, ©Recommandations professionnelles *Cancer du poumon non à petites cellules*, C.R.r. Boulogne-Billancourt, Editor. 2010, Boulogne-Billancourt.
8. Abadjian. *Histopathologie des organes*. 2006.
9. Cotran, K., Collins, *Anatomie pathologique, bases morphologiques et physiopathologiques des maladies*. 2000: Piccin.
10. Travis, W.D., 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): p. 244-85.
11. Travis, W.D., 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*. **6**(2): p. 244-85.
12. Travis, E.B., C.C. Harris, and H.K. Muller-Hermelink, eds, ed. *Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics, ed. L.I. Press. 2004. pp. 12-15.
13. bishop. *an immunohistochemical vade mecum*. 2010.
14. Bishop, J.A., et al., *p40 (DeltaNp63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma*. *Mod Pathol*, 2011. **25**(3): p. 405-15.
15. Lababede, O., M. Meziane, and T. Rice, *Seventh edition of the cancer staging manual and stage grouping of lung cancer: quick reference chart and diagrams*. *Chest*, 2011. **139**(1): p. 183-9.
16. Oncolor. *Référentiels, cancers bronchiques non à petites cellules*. 2009.
17. INCa, ©*Mutations de l'EGFR dans le cancer du poumon : mise en évidence d'une cible moléculaire permettant un accès spécifique aux thérapies ciblées*, Boulogne-Billancourt, Editor. 2010.
18. Nowak, F., J.C. Soria, and F. Calvo, *Tumour molecular profiling for deciding therapy-the French initiative*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2012. **9**(8): p. 479-86.
19. de La Motte Rouge, T., et al., [Clinical and molecular predictors of response to EGFR tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer]. *Ann Pathol*, 2007. **27**(5): p. 353-63.
20. Reiter, J.L., et al., *Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms*. *Genomics*, 2001. **71**(1): p. 1-20.
21. Carlson, J.J., et al., *Epidermal growth factor receptor genomic variation in NSCLC patients receiving tyrosine kinase inhibitor therapy: a systematic review and meta-analysis*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009. **135**(11): p. 1483-93.
22. Mitsudomi, T. and Y. Yatabe, *Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer*. *FEBS J*. **277**(2): p. 301-8.

23. Jorissen, R.N., et al., *Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling*. *Exp Cell Res*, 2003. **284**(1): p. 31-53.
24. Ono, M. and M. Kuwano, *Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(24): p. 7242-51.
25. Zhang, X., et al., *An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor*. *Cell*, 2006. **125**(6): p. 1137-49.
26. Suda, K., K. Tomizawa, and T. Mitsudomi, *Biological and clinical significance of KRAS mutations in lung cancer: an oncogenic driver that contrasts with EGFR mutation*. *Cancer Metastasis Rev*, 2010. **29**(1): p. 49-60.
27. Ruppert, A.M., et al., *[A simple view on lung cancer biology: The EGFR pathway]*. *Rev Mal Respir*, 2011. **28**(4): p. 565-77.
28. Bronte, G., et al., *Driver mutations and differential sensitivity to targeted therapies: a new approach to the treatment of lung adenocarcinoma*. *Cancer Treat Rev*, 2010. **36 Suppl 3**: p. S21-9.
29. Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. *Cell*, 2010. **141**(7): p. 1117-34.
30. Lacroix, L., et al., *[KRAS status versus EGFR status in lung cancer therapy]*. *Bull Cancer*, 2009. **96 Suppl**: p. S75-83.
31. Sekido, Y., K.M. Fong, and J.D. Minna, *Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1378**(1): p. F21-59.
32. Brandt, B., et al., *Mechanisms of egfr gene transcription modulation: relationship to cancer risk and therapy response*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(24): p. 7252-60.
33. Lynch, T.J., et al., *Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(21): p. 2129-39.
34. Okamoto, I., et al., *Expression of constitutively activated EGFRvIII in non-small cell lung cancer*. *Cancer Sci*, 2003. **94**(1): p. 50-6.
35. Pao, W., et al., *EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(36): p. 13306-11.
36. Ji, H., et al., *The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in vivo sensitivity to EGFR-targeted therapies*. *Cancer Cell*, 2006. **9**(6): p. 485-95.
37. Ohashi, K., et al., *Induction of lung adenocarcinoma in transgenic mice expressing activated EGFR driven by the SP-C promoter*. *Cancer Sci*, 2008. **99**(9): p. 1747-53.
38. Mok, T.S., et al., *Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(10): p. 947-57.
39. Dahabreh, I.J., et al., *Somatic EGFR mutation and gene copy gain as predictive biomarkers for response to tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer*. *Clin Cancer Res*, 2009. **16**(1): p. 291-303.
40. Liang, Z., et al., *Relationship between EGFR expression, copy number and mutation in lung adenocarcinomas*. *BMC Cancer*, 2010. **10**: p. 376.
41. Nakamura, H., et al., *Survival impact of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis*. *Thorax*, 2006. **61**(2): p. 140-5.
42. Akimoto, T., et al., *Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas*. *Clin Cancer Res*, 1999. **5**(10): p. 2884-90.
43. Chen, Z., et al., *Correlation of cisplatin sensitivity with differential alteration of EGFR expression in head and neck cancer cells*. *Anticancer Res*, 2000. **20**(2A): p. 899-902.

44. Li, A.R., et al., *EGFR mutations in lung adenocarcinomas: clinical testing experience and relationship to EGFR gene copy number and immunohistochemical expression*. J Mol Diagn, 2008. **10**(3): p. 242-8.
45. Hirsch, F.R., et al., *Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a Southwest Oncology Group Study*. J Clin Oncol, 2005. **23**(28): p. 6838-45.
46. Tiseo, M., et al., *Predictors of gefitinib outcomes in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): study of a comprehensive panel of molecular markers*. Lung Cancer, 2009. **67**(3): p. 355-60.
47. Hirsch, F.R., et al., *Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2006. **24**(31): p. 5034-42.
48. Tsao, M.S., et al., *Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome*. N Engl J Med, 2005. **353**(2): p. 133-44.
49. Pinter, F., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGFR) high gene copy number and activating mutations in lung adenocarcinomas are not consistently accompanied by positivity for EGFR protein by standard immunohistochemistry*. J Mol Diagn, 2008. **10**(2): p. 160-8.
50. Pirker, R., et al., *EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study*. Lancet Oncol, 2011. **13**(1): p. 33-42.
51. Cheng, L., et al., *Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine*. Mod Pathol, 2012. **25**(3): p. 347-69.
52. Mitsudomi, T. and Y. Yatabe, *Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer*. FEBS J, 2009. **277**(2): p. 301-8.
53. Gazdar, A.F., *Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors*. Oncogene, 2009. **28 Suppl 1**: p. S24-31.
54. Politi, K. and T.J. Lynch, *Two Sides of the Same Coin: EGFR Exon 19 Deletions and Insertions in Lung Cancer*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(6): p. 1490-2.
55. Yatabe, Y., *EGFR mutations and the terminal respiratory unit*. Cancer Metastasis Rev, 2010. **29**(1): p. 23-36.
56. Shigematsu, H. and A.F. Gazdar, *Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers*. Int J Cancer, 2006. **118**(2): p. 257-62.
57. Tanner, N.T., et al., *The role of molecular analyses in the era of personalized therapy for advanced NSCLC*. Lung Cancer, 2011. **76**(2): p. 131-7.
58. Hammerman, P.S., et al., *Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer*. Cancer Discov, 2012. **1**(1): p. 78-89.
59. Ji, H., et al., *Epidermal growth factor receptor variant III mutations in lung tumorigenesis and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(20): p. 7817-22.
60. Simonetti, S., et al., *Detection of EGFR mutations with mutation-specific antibodies in stage IV non-small-cell lung cancer*. J Transl Med, 2010. **8**: p. 135.
61. Brevet, M., M. Arcila, and M. Ladanyi, *Assessment of EGFR mutation status in lung adenocarcinoma by immunohistochemistry using antibodies specific to the two major forms of mutant EGFR*. J Mol Diagn, 2010. **12**(2): p. 169-76.
62. An, S.J., et al., *Identification of enriched driver gene alterations in subgroups of non-small cell lung cancer patients based on histology and smoking status*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e40109.
63. Greulich, H., et al., *Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutants*. PLoS Med, 2005. **2**(11): p. e313.

64. Kumar, A., et al., *Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(10): p. 1742-51.
65. Gazdar, A.F., et al., *Mutations and addiction to EGFR: the Achilles 'heel' of lung cancers?* Trends Mol Med, 2004. **10**(10): p. 481-6.
66. Cappuzzo, F., et al., *Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study*. Lancet Oncol, 2010. **11**(6): p. 521-9.
67. Shepherd, F.A., et al., *Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(2): p. 123-32.
68. Bell, D.W., et al., *Epidermal growth factor receptor mutations and gene amplification in non-small-cell lung cancer: molecular analysis of the IDEAL/INTACT gefitinib trials*. J Clin Oncol, 2005. **23**(31): p. 8081-92.
69. Pao, W. and J. Chmielecki, *Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(11): p. 760-74.
70. Rosell, R., et al., *Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer*. N Engl J Med, 2009. **361**(10): p. 958-67.
71. Cataldo, V.D., et al., *Treatment of non-small-cell lung cancer with erlotinib or gefitinib*. N Engl J Med, 2011. **364**(10): p. 947-55.
72. Jackman, D.M., et al., *Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(13): p. 3908-14.
73. Kobayashi, S., et al., *EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib*. N Engl J Med, 2005. **352**(8): p. 786-92.
74. Yun, C.H., et al., *The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(6): p. 2070-5.
75. Pao, W., et al., *Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain*. PLoS Med, 2005. **2**(3): p. e73.
76. Engelman, J.A., et al., *MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling*. Science, 2007. **316**(5827): p. 1039-43.
77. Bean, J., et al., *MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(52): p. 20932-7.
78. Lee, Y.J., et al., *Lung cancer in never smokers: change of a mindset in the molecular era*. Lung Cancer, 2011. **72**(1): p. 9-15.
79. Balak, M.N., et al., *Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(21): p. 6494-501.
80. Bean, J., et al., *Acquired resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors associated with a novel T854A mutation in a patient with EGFR-mutant lung adenocarcinoma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(22): p. 7519-25.
81. Costa, D.B., *To re-treat or not with gefitinib/erlotinib: This is the question for tyrosine kinase inhibitor-responsive lung cancers that progress*. Lung Cancer, 2007. **57**(2): p. 251-2.
82. Yokouchi, H., et al., *Clinical benefit of readministration of gefitinib for initial gefitinib-responders with non-small cell lung cancer*. BMC Cancer, 2007. **7**: p. 51.
83. Oh, I.J., et al., *Retreatment of gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer who previously controlled to gefitinib: A single-arm, open-label, phase II study*. Lung Cancer, 2012.
84. Ghosh, G., et al., *Properties of resistant cells generated from lung cancer cell lines treated with EGFR inhibitors*. BMC Cancer, 2012. **12**(1): p. 95.

85. Koze, Y., et al., *The usefulness of mutation-specific antibodies in detecting epidermal growth factor receptor mutations and in predicting response to tyrosine kinase inhibitor therapy in lung adenocarcinoma*. Lung Cancer, 2010. **73**(1): p. 45-50.
86. Funabashi, K.S., et al., *DNA extraction and molecular analysis of non-tumoral liver, spleen, and brain from autopsy samples: The effect of formalin fixation and paraffin embedding*. Pathol Res Pract, 2012.
87. Greer, C.E., et al., *PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time*. Am J Clin Pathol, 1991. **95**(2): p. 117-24.
88. Zhao, J., et al., *A novel method for detection of mutation in epidermal growth factor receptor*. Lung Cancer, 2011. **74**(2): p. 226-32.
89. Yu, J., et al., *Mutation-specific antibodies for the detection of EGFR mutations in non-small-cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(9): p. 3023-8.
90. Ilie, M.I., et al., *Usefulness of tissue microarrays for assessment of protein expression, gene copy number and mutational status of EGFR in lung adenocarcinoma*. Virchows Arch, 2010. **457**(4): p. 483-95.
91. Kawahara, A., et al., *Molecular diagnosis of activating EGFR mutations in non-small cell lung cancer using mutation-specific antibodies for immunohistochemical analysis*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(12): p. 3163-70.
92. Kitamura, A., et al., *Immunohistochemical detection of EGFR mutation using mutation-specific antibodies in lung cancer*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(13): p. 3349-55.
93. Der, C.J., T.G. Krontiris, and G.M. Cooper, *Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(11): p. 3637-40.
94. DeClue, J.E., et al., *Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis*. Cell, 1992. **69**(2): p. 265-73.
95. Bos, J.L., *The ras gene family and human carcinogenesis*. Mutat Res, 1988. **195**(3): p. 255-71.
96. Trahey, M. and F. McCormick, *A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants*. Science, 1987. **238**(4826): p. 542-5.
97. Schaber, M.D., et al., *Polyisoprenylation of Ras in vitro by a farnesyl-protein transferase*. J Biol Chem, 1990. **265**(25): p. 14701-4.
98. Avruch, J., et al., *Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade*. Recent Prog Horm Res, 2001. **56**: p. 127-55.
99. Santos, E., et al., *Malignant activation of a K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient*. Science, 1984. **223**(4637): p. 661-4.
100. Rodenhuis, S., et al., *Mutational activation of the K-ras oncogene and the effect of chemotherapy in advanced adenocarcinoma of the lung: a prospective study*. J Clin Oncol, 1997. **15**(1): p. 285-91.
101. Marchetti, A., et al., *Bronchioloalveolar lung carcinomas: K-ras mutations are constant events in the mucinous subtype*. J Pathol, 1996. **179**(3): p. 254-9.
102. Kosaka, T., et al., *Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications*. Cancer Res, 2004. **64**(24): p. 8919-23.
103. Shigematsu, H., et al., *Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(5): p. 339-46.
104. Kosaka, T., et al., *Prognostic implication of EGFR, KRAS, and TP53 gene mutations in a large cohort of Japanese patients with surgically treated lung adenocarcinoma*. J Thorac Oncol, 2009. **4**(1): p. 22-9.
105. Mascaux, C., et al., *The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis*. Br J Cancer, 2005. **92**(1): p. 131-9.

106. Loriot, Y., et al., *Are RAS mutations predictive markers of resistance to standard chemotherapy?* Nat Rev Clin Oncol, 2009. **6**(9): p. 528-34.
107. Eberhard, D.A., et al., *Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib.* J Clin Oncol, 2005. **23**(25): p. 5900-9.
108. Mao, C., et al., *KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies.* Lung Cancer, 2009. **69**(3): p. 272-8.
109. Linardou, H., et al., *Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer.* Lancet Oncol, 2008. **9**(10): p. 962-72.
110. Filipits, M. and R. Pirker, *Predictive markers in the adjuvant therapy of non-small cell lung cancer.* Lung Cancer, 2011. **74**(3): p. 355-63.
111. Pao, W. and N. Girard, *New driver mutations in non-small-cell lung cancer.* Lancet Oncol, 2011. **12**(2): p. 175-80.
112. Heinmoller, P., et al., *HER2 status in non-small cell lung cancer: results from patient screening for enrollment to a phase II study of herceptin.* Clin Cancer Res, 2003. **9**(14): p. 5238-43.
113. Shigematsu, H., et al., *Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas.* Cancer Res, 2005. **65**(5): p. 1642-6.
114. Tomizawa, K., et al., *Prognostic and predictive implications of HER2/ERBB2/neu gene mutations in lung cancers.* Lung Cancer, 2011. **74**(1): p. 139-44.
115. Han, S.W., et al., *Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation, K-ras mutation, and Akt phosphorylation.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(8): p. 2538-44.
116. Wang, S.E., et al., *HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors.* Cancer Cell, 2006. **10**(1): p. 25-38.
117. Cappuzzo, F., L. Bemis, and M. Varella-Garcia, *HER2 mutation and response to trastuzumab therapy in non-small-cell lung cancer.* N Engl J Med, 2006. **354**(24): p. 2619-21.
118. Planchard, D. and E. Giroux Leprieur, *[Biomarkers and targeted therapies in non-small cell lung cancer: present and future treatments].* Rev Pneumol Clin, 2011. **67** **Suppl 1**: p. S36-40.
119. Yousem, S.A., M. Nikiforova, and Y. Nikiforov, *The histopathology of BRAF-V600E-mutated lung adenocarcinoma.* Am J Surg Pathol, 2008. **32**(9): p. 1317-21.
120. Scagliotti, G., et al., *Phase III study of carboplatin and paclitaxel alone or with sorafenib in advanced non-small-cell lung cancer.* J Clin Oncol, 2010. **28**(11): p. 1835-42.
121. Kang, S., A.G. Bader, and P.K. Vogt, *Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(3): p. 802-7.
122. Yamamoto, H., et al., *PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers.* Cancer Res, 2008. **68**(17): p. 6913-21.
123. Ludovini, V., et al., *Phosphoinositide-3-kinase catalytic alpha and KRAS mutations are important predictors of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced non-small cell lung cancer.* J Thorac Oncol, 2011. **6**(4): p. 707-15.
124. Courtney, K.D., R.B. Corcoran, and J.A. Engelman, *The PI3K pathway as drug target in human cancer.* J Clin Oncol, 2010. **28**(6): p. 1075-83.

125. Engelman, J.A., et al., *Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers*. Nat Med, 2008. **14**(12): p. 1351-6.
126. Soda, M., et al., *Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer*. Nature, 2007. **448**(7153): p. 561-6.
127. Shaw, A.T., et al., *Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK*. J Clin Oncol, 2009. **27**(26): p. 4247-53.
128. Jokoji, R., et al., *Combination of morphological feature analysis and immunohistochemistry is useful for screening of EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma*. J Clin Pathol, 2010. **63**(12): p. 1066-70.
129. Paik, J.H., et al., *Clinicopathologic implication of ALK rearrangement in surgically resected lung cancer A proposal of diagnostic algorithm for ALK-rearranged adenocarcinoma*. Lung Cancer, 2011.
130. Wong, D.W., 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): p. 1723-33.
131. Naoki, K., et al., *The PCR-invader method (structure-specific 5' nuclease-based method), a sensitive method for detecting EGFR gene mutations in lung cancer specimens; comparison with direct sequencing*. Int J Clin Oncol, 2011. **16**(4): p. 335-44.
132. Rodig, S.J., et al., *Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(16): p. 5216-23.
133. Ou, S.H., et al., *Activity of crizotinib (PF02341066), a dual mesenchymal-epithelial transition (MET) and anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor, in a non-small cell lung cancer patient with de novo MET amplification*. J Thorac Oncol, 2011. **6**(5): p. 942-6.
134. Sasaki, T., et al., *The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer*. Eur J Cancer, 2010. **46**(10): p. 1773-80.
135. Costa, D.B., et al., *Effects of erlotinib in EGFR mutated non-small cell lung cancers with resistance to gefitinib*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(21): p. 7060-7.
136. Eder, J.P., et al., *Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(7): p. 2207-14.
137. Lee, J.S., Park K, Kim S.W., Lee D.H., Kim H.T., Ham J.Y., al, *a randomized phase III study of gefitinib (Iressa) versus standard chemotherapy (gemcitabine plus cisplatin) as a first line treatment fir never-smokers with advanced or metastatic adenocarcinoma of the lung*. J Thorac Oncol, 2009. **4**(9 Suppl.1): p. S283-4.
138. Mitsudomi, T., et al., *Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2009. **11**(2): p. 121-8.
139. Maemondo, M., et al., *Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR*. N Engl J Med, 2010. **362**(25): p. 2380-8.
140. Zhou, C., *Updated efficacy and quality-of-life analyses in OPTIMAL, a phase III, randomized, open-label study of first-line erlotinib versus gemcitabine/carboplatin in patients with EGFR-activating mutation-positive advanced non-small-lung cancer*. J Clin Oncol, 2011. **29** (Suppl.).
141. Rosell, R., et al., *Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2012. **13**(3): p. 239-46.
142. Brugger, W., et al., *Prospective molecular marker analyses of EGFR and KRAS from a randomized, placebo-controlled study of erlotinib maintenance therapy in advanced non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2011. **29**(31): p. 4113-20.

143. Oxnard, G.R., et al., *Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation*. Clin Cancer Res, 2010. **17**(6): p. 1616-22.
144. Macherey-Nagel, *Genomic DNA from forensic samples (User manual) NucleoMag 96 Trace*. 2006.
145. Macherey-Nagel. *NucleoSpin® FFPE DNA*. 2012.
146. Bienvenu, T., et al., [*Different procedures for the isolation of DNA from blood samples*]. Ann Biol Clin (Paris), 1999. **57**(1): p. 77-84.
147. Pan, Q., W. Pao, and M. Ladanyi, *Rapid polymerase chain reaction-based detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in lung adenocarcinomas*. J Mol Diagn, 2005. **7**(3): p. 396-403.
148. Su, Z., et al., *A platform for rapid detection of multiple oncogenic mutations with relevance to targeted therapy in non-small-cell lung cancer*. J Mol Diagn, 2011. **13**(1): p. 74-84.
149. AppliedBiosystems, *ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex Kit*. 2010.
150. Hurst, C.D., et al., *A SNaPshot assay for the rapid and simple detection of four common hotspot codon mutations in the PIK3CA gene*. BMC Res Notes, 2009. **2**: p. 66.
151. Key, *Immunochemical staining methods*. 4th ed, ed. e. M. 2001: Dako Corporation, Carpinteria
152. Didelot, A., et al., *Competitive allele specific TaqMan PCR for KRAS, BRAF and EGFR mutation detection in clinical formalin fixed paraffin embedded samples*. Exp Mol Pathol, 2012. **92**(3): p. 275-80.
153. Landis, J.R. and G.G. Koch, *The measurement of observer agreement for categorical data*. Biometrics, 1977. **33**(1): p. 159-74.
154. Duffaud, F. and P. Therasse, [*New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors*]. Bull Cancer, 2000. **87**(12): p. 881-6.
155. WHO, *handbook for reporting results of cancer treatment*. Geneva (Switzerland) : World Health Organization Offset Publication n° 48 1979.
156. INCa, © *Synthèse de l'activité des plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers en 2010*. . Collection Rapports & synthèses, ouvrage collectif édité par l'INCa, Boulogne-Billancourt, 2010.
157. INCa, © *Les tests de génétique moléculaire pour l'accès aux thérapies ciblées*. Collection Rapports & synthèses, ouvrage collectif édité par l'INCa, Boulogne-Billancourt, 2011.

VU

NANCY, le 17 juillet 2012

Le Président de Thèse

Professeur J-M. VIGNAUD

NANCY, le 17 juillet 2012

Le Doyen de la Faculté de Médecine

Par délégation,

Mme le Professeur M.C. BÉNÉ

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE 4041

NANCY, le 24 juillet 2012

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Professeur P. MUTZENHARDT

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Introduction : En 2010, la plateforme d'Oncologie Moléculaire du CHU-CAV de Nancy met en place la recherche des mutations du gène de l'EGFR et celle d'autres biomarqueurs émergents, dans le cancer du poumon, 1^{ère} cause de mortalité par cancer en France. Certaines de ces mutations sont prédictives de réponse aux inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK), pour les patients atteints d'adénocarcinome.

Matériel et méthodes : Il a été réalisé le bilan de l'analyse du statut mutationnel de 1000 patients consécutifs. L'étude a porté sur le type et la fréquence des mutations, les caractéristiques des tumeurs et des patients présentant une mutation, l'intérêt de l'évaluation de la richesse tumorale en préanalytique, la place de l'immunohistochimie dans cette recherche et la prescription des ITK chez ces patients.

Résultats : Il a été détecté 82 mutations du gène de l'EGFR (8,8 %), dont 33 délétions de 15pb de l'exon 19 et 33 mutations L858R. La sensibilité globale de l'immunohistochimie était de 60% et l'indice de corrélation entre les observateurs pour l'évaluation de la richesse tumorale était de 0,31 à 0,73. Le traitement par ITK était efficace chez 29 patients.

Discussion : Cette étude rétrospective portant sur les patients lorrains permet d'affirmer que cette population, atteinte d'adénocarcinomes, présente les mêmes profils mutationnels que celle du reste de la France. Le traitement par inhibiteurs de la tyrosine kinase a déjà montré ses preuves dans des études récentes mais grâce à un recul plus important, son efficacité pourra être mieux précisée.

TITRE EN ANGLAIS

Results of the analysis of EGFR mutational status in 1000 patients with lung adenocarcinomas supported by Molecular Oncology platform in CHU-CAV of Nancy.

THÈSE : MÉDECINE SPÉCIALISÉE – ANNÉE 2012

MOTS CLEFS: EGFR – biomarqueurs – poumon – adénocarcinome – biologie moléculaire – immunohistochimie – inhibiteurs de la tyrosine kinase.

INTITULÉ ET ADRESSE :

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
Faculté de Médecine de Nancy
9, avenue de la Forêt de Haye
54505 VANDOEUVRE LES NANCY Cedex
