HAL
open science

Marqueurs moléculaires et thérapies ciblées : exemple des mutations de l'EGFR et de KRAS comme marqueurs prédictifs de réponse aux agents ciblant l'EGFR

Sandrine Dufort

▶ **To cite this version:**

Sandrine Dufort. Marqueurs moléculaires et thérapies ciblées : exemple des mutations de l'EGFR et de KRAS comme marqueurs prédictifs de réponse aux agents ciblant l'EGFR. Sciences pharmaceutiques. 2009. dumas-00853154

HAL Id: dumas-00853154

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00853154

Submitted on 22 Aug 2013

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

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

Université Joseph Fourier GRENOBLE PHARMACIE

SICD1 Bibliothèques de l'UJF et de Grenoble INP

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 n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

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 au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.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 JOSEPH FOURIER

Faculté de PHARMACIE de GRENOBLE

Année : 2009 **Thèse n°**

Marqueurs moléculaires et thérapies ciblées : exemple des mutations de l'*EGFR* et de *KRAS* comme marqueurs prédictifs de réponse aux agents ciblant l'EGFR

Mémoire du Diplôme d'Études Spécialisées

Discipline Pharmacie Spécialisée

Conformément aux dispositions du décret n°90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THESE

Présentée à la Faculté de Pharmacie de Grenoble

Et soutenue publiquement le 15 avril 2009

Pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

Par **Sandrine DUFORT**

Née le 29 octobre 1980 à Cherbourg (50)

Devant le jury interrégional composé de :

Président : Monsieur le Pr Patrice Faure

Membres : Madame le Dr Juliette Vergnaud

Monsieur le Pr Denis Moro-Sibilot

Madame le Pr Sylvie Lantuejoul

Madame le Dr Florence de Fraipont (directeur de thèse)

UFR
de PHARMACIE
de GRENOBLE

UNIVERSITE
JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**
Vice -Doyen : Mme **Edwige NICOLLE**

Année 2008-2009
Mise à jour : le 6 octobre 2008

PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (LR)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wilhelm	Physique (U.V.H.C.I)
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (CHU)
DANEL	Vincent	Toxicologie (CHU SAMU-SMUR)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Emmanuel	Immunologie / Microbiologie (U.V.H.C.I)
FAURE	Patrice	Biochimie (DBI / CHU)
FAVIER	Alain	Professeur Emérite
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
GRILLOT	Renée	Parasitologie - Mycologie Médicale (Directeur UFR et CHU)
MARIOTTE	Anne-Marie	Pharmacognosie (D.P.M.)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
SEVE	Michel	Biotechnologie (CHU / CRI IAB)
RIBUOT	Christophe	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie Nutrition (L.B.F.A)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST)

CHAMPON	Bernard	Pharmacie officine
RIEU	Isabelle	Qualitologie (CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (CHU)

PROFESSEUR AGREGE (PRAG)

GAUCHARD	Pierre Alexis	Chimie Inorganique (D.P.M.)

CHU : Centre Hospitalier Universitaire
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
LBFA : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

UFR
de PHARMACIE
de GRENOBLE

UNIVERSITE
JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**
Vice -Doyen : Mme **Edwige NICOLLE**

Année 2008-2009

MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie - Mycologie (L.A.P.M)
ALLENET	Benoît	Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG / CHU)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A / CHU)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (U.V.H.C.I)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique Economie Santé
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (N.V.M.C)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S.)
ESNAULT	Danielle	Chimie Analytique (D.P.M.)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M.)
GERMI	Raphaële	Microbiologie (I.V.H.C.I. / CHU)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M.)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M.)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie –Pharmacologie (HP2)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M.)
MELO DE LIMA	Christelle	Probabilités Biostatistiques (LE.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Organique (D.P.M.)
PINEL	Claudine	Parasitologie - Mycologie Médicale (CIB / CHU)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M.)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M.)
RICHARD	Jean Michel	Service Accueil Handicap (Direction)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie organique (D.P.M.)
VILLET	Annick	Chimie Analytique (D.P.M.)

ENSEIGNANTS ANGLAIS

COLLE Pierre Emmanuel	Maître de Conférence
FITE Andrée	Professeur Certifié
GOUBIER Laurence	Professeur Certifié

ATER

1 ATER	**RECHOUM** Yassine	Immunologie / DMBMT
1 ATER	**GLADE** Nicolas	Biophysique
½ ATER	**RUTA** Joséphine	Chimie Analytique
1 ATER	**NZENGUE** Yves	Biologie cellulaire / DMBMT
1 ATER	**ELAZZOUZI** Samira	Pharmacie Galénique
1 ATER	**VERON** Jean Baptiste	Chimie Organique
1 ATER	**HADJ SALEM** Jamila	Pharmacognosie
½ ATER	**REINICKE** Anne Teresa	Pharmacologie
1 ATER	**CHENAU** Jérôme	DMBMT
1 ATER	**NASER EDDINE** Abeer	Anglais

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
DMBMT : Département Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

REMERCIEMENTS

J'adresse mes premiers remerciements au Professeur Alain Favier pour m'avoir accueillie au sein du Département de Biologie Intégrée du CHU de Grenoble et pour m'avoir conseillée tout au long de mon cursus.

Je remercie le Docteur Marie-Jeanne Richard, pour m'avoir accueillie au sein de l'Unité Fonctionnelle de Cancérologie biologique et Biothérapies, et pour m'avoir permis d'y réaliser ce travail. Merci pour ses remarques, toujours enrichissantes.

Je remercie le Professeur Patrice Faure pour m'avoir fait l'honneur d'être le président de mon jury. Je le remercie de m'accueillir au sein du DBI, ainsi que pour son soutien et sa disponibilité. Veuillez trouver ici l'assurance de mon profond respect.

Je remercie tout particulièrement le Docteur Florence de Fraipont pour m'avoir proposé de travailler avec elle tout au long de mes années d'internat et pour avoir accepté d'être le directeur de cette thèse. Je la remercie pour son encadrement, sa gentillesse, sa patience, son soutien et sa disponibilité sans faille.

Merci à eux pour la confiance qu'ils m'ont toujours accordé et pour la chance qu'ils ont su me donner.

Je remercie le Docteur Juliette Vergnaud d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.

Je remercie le Professeur Denis Moro-Sibilot de m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie le Professeur Sylvie Lantuejoul d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse pour juger mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.

Je remercie Valérie, technicienne ès séquençage, pour m'avoir initiée au séquençage lorsque je suis arrivée au laboratoire. Je la remercie pour son aide, ses conseils, toutes les heures passées à purifier, sa gentillesse et sa bonne humeur sans faille.

Je ne saurais oublier toutes les techniciennes de l'UF Cancérologie biologique et Biothérapies, Odile, Maryse, Monique, Jacquotte et Emilie, pour leur gaieté. Je les remercie pour la bonne humeur qui règne au laboratoire et qui rend les conditions de travail bien agréables.

Je remercie mes parents pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Merci pour votre confiance et pour m'avoir laissé suivre ma route tout en m'épaulant, et ce malgré la distance qui nous sépare.

Je remercie Mathieu, mon « frérot », pour son soutien et pour tous les bons moments passés, présents et à venir. Je serai toujours là pour lui.

Je remercie les Aspiraliennes et les Aspiraliens pour faire vivre la filière Pharmacie Spécalisée dans la région Rhône Alpes. Je les remercie pour leur soutien et pour tous leurs conseils. A Sandrine, Caroline, Soline, Paul, Xavier, Delphine, Marie-Laurence, Julia, Céline, Séverine et les autres.

Je remercie ma famille et mes amis pour leur gentillesse, leur soutien et leurs encouragements. A ma grand-mère, Martine et Jacques, Annick et Bernard, Agathe et Philippe, Sandrine et Emmanuel, Mélanie, Damien, Odile, Cyr, Claire et tous ceux qui cherchent désespérément leur nom dans ces lignes.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

Index des illustrations

Abréviations

INTRODUCTION 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 2

Première partie : Les cancers broncho-pulmonaires 2

Chapitre 1 : Epidémiologie des cancers broncho-pulmonaires 2

1 . Données chiffrées 2

2 . Les facteurs étiologiques 2

Chapitre 2 : Classifications histologique et pathologique des cancers broncho-pulmonaires 4

1 . Classification histologique 4

1.1 . Les Carcinomes Broncho-pulmonaires à Petites Cellules 4

1.2 . Les Carcinomes Broncho-pulmonaires Non à Petites Cellules 5

1.2.1 . Les carcinomes malpighiens 5

1.2.2 . Les adénocarcinomes 5

1.2.3 . Les carcinomes à grandes cellules 6

2 . Classification pathologique pTNM 6

Chapitre 3 : Prise en charge thérapeutique des CBNPC 7

1 . La chirurgie 7

2 . La radiothérapie 8

3 . La chimiothérapie 9

3.1 . Les chimiothérapies conventionnelles 9

3.2 . Les thérapies ciblées 9

Deuxième partie : Les cancers colorectaux 11

Chapitre 1 : Epidémiologie des cancers colorectaux 11

1 . Données chiffrées 11

2 . Les facteurs étiologiques 12

Chapitre 2 : Dépistage et diagnostic des cancers colorectaux 13
1 . Le dépistage des cancers colorectaux 13
2 . Le diagnostic des cancers colorectaux 13
Chapitre 3 : Classifications histologique et pathologique des cancers broncho-pulmonaires 15
1 . Classification histologique selon l'OMS 15
1.1 . Les adénocarcinomes 15
1.2 . Les formes histologiques particulières 15
2 . Classification pathologique pTNM 16
Chapitre 4 : Prise en charge thérapeutique des cancers colorectaux 17
1 . La chirurgie 17
2 . La radiothérapie 18
3 . La chimiothérapie 19
3.1 . Molécules anti-tumorales conventionnelles 19
3.2 . Les thérapies ciblées 20

Troisième partie : Du récepteur à l'EGF aux thérapies ciblées 21
Chapitre 1 : Le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) 21
1 . La famille de l'EGFR 21
1.1. Structure des récepteurs 21
1.2 . Les ligands des récepteurs de la famille EGFR 22
2 . Activation de l'EGFR et voies de régulation 22
3 . Les fonctions de l'EGFR 24
3.1 . Rôle physiologique de l'EGFR 24
3.2 . Implication de l'EGFR dans la carcinogenèse 24
3.2.1 . Rôle de l'EGFR dans la carcinogenèse pulmonaire 25
3.2.2 . Rôle de l'EGFR dans la carcinogenèse colorectale 26
Chapitre 2 : Les thérapeutiques ciblant l'EGFR 27
1 . Les anticorps monoclonaux 27
1.1 . Le cetuximab 28
1.2 . Le panitumumab 30
1.3 . Tolérance aux anticorps monoclonaux anti-EGFR 30

2 . Les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKIs) 30
2.1 . Le gefitinib 31
2.2 . L'erlotinib 33
2.3 . Tolérance aux TKIs 34

Quatrième partie : Facteurs moléculaires prédictifs de la réponse ou de la résistance aux thérapies ciblées de l'EGFR 35
Chapitre 1 : Les mutations de l'EGFR 35
Chapitre 2 : Les mutations de KRAS 37
Chapitre 3 : Méthodes de détection des mutations de l'*EGFR* et de *KRAS* 38
1 . La méthode de référence : le séquençage direct 38
2 . Génotypage par méthode SNaPshot 39
3 . Le pyroséquençage 40
4 . Génotypage par PCR-ASO 41
5 . Génotypage par PCR-RFLP 41
6 . Génotypage par PCR en temps réel 41
6.1 . A l'aide de sondes d'hydrolyse 41
6.2 . A l'aide d'amorces Scorpions® 42
6.3 . Courbe de fusion à haute résolution (High Resolution Melting-HMR) ... 43
7 . Polymorphisme de conformation simple brin (single strand conformation polymorphism, SSCP) 43
8 . Chromatographie liquide haute performance en gradient de dénaturation 43

TRAVAIL DE THESE **45**
Première partie : Le projet ERMETIC 45
1 . Le contexte 45
2 . Les objectifs du projet ERMETIC 46
3 . L'étude rétrospective 46
4 . L'étude prospective 48
5 . Discussion des résultats de l'étude ERMETIC 49

Deuxième partie : Mise au point de la recherche des mutations par pyroséquençage 51

1 . Démarche suivie pour la mise au point 51

2 . Recherche des mutations du gène *KRAS* 52

3 . Discussion de l'analyse du statut de *KRAS* par pyroséquençage 64

4 . Recherche des mutations du gène *EGFR* 65

4.1 . Mutation L858R de l'exon 21 65

4.2 . Mutation de résistance T790M de l'exon 20 66

4.3 . Délétion LREA de l'exon 19 67

5 . Discussion de l'analyse de mutations de l'EGFR par pyroséquençage 68

CONCLUSIONS **69**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **71**

ANNEXES **82**

INDEX

DES

ILLUSTRATIONS

INDEX DES ILLUSTRATIONS

Revue Bibliographique

Figure 1 : Incidence et mortalité des cancers en Europe en 2006. ..... 2'
Tableau I : Classification pTNM et stadification des tumeurs broncho-pulmonaires. ..... 6'
Tableau II : Alimentation et cancer colorectal : facteurs de risque et de protection, par niveaux de certitude ..... 12'
Tableau III : Classification TNM de tumeurs colorectales. ..... 15'
Figure 2 : Stadification des tumeurs colorectales ..... 16'
Figure 3 : Structure schématique des récepteurs de la famille HER. ..... 21'
Tableau IV : Les facteurs de croissance analogues à l'EGF et leurs récepteurs. ..... 22'
Figure 4 : Voies de signalisation contrôlée par l'activation de l'EGFR ..... 23'
Tableau V : Niveau d'expression des récepteurs HER dans les tumeurs humaines. ..... 25'
Tableau VI : Caractéristiques fonctionnelles et pharmacologiques des inhibiteurs de l'EGFR. 27'
Figure 5 : Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux anti-EGFR sur les cellules tumorales ..... 28'
Tableau VII : Principaux anticorps monoclonaux et leur stade de développement clinique. ..... 28'
Figure 6 : Mécanismes d'action des molécules anti-EGFR sur les cellules tumorales. ..... 30'
Figure 7 : Structures chimiques des inhibiteurs de tyrosines kinase de l'EGFR. ..... 31'
Figure 8 : Mutations du domaine kinase du récepteur à l'EGF dans les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) ..... 36'
Figure 9 : Effets des mutations du domaine Tyrosine Kinase sur la poche de liaison de l'ATP.36'
Figure 10 : Activation de RAS ..... 37'
Tableau VIII : Méthodes de détection des mutations du gène *EGFR* et/ou du gène *KRAS*..... 38'
Figure 11 : Principe du séquençage selon la méthode de Sanger ..... 39'
Figure 12 : Principe du pyroséquençage. ..... 40'
Figure 13 : Principe des sondes TaqMan®. ..... 42'
Figure 14 : Principe du génotypage utilisant des amorces Scorpions®. ..... 42'

Travail de thèse

Figure 15 : Organisation de l'étude rétrospective du projet ERMETIC. ..... 46'
Tableau IX : Résultats des mutations et délétions détectées à Grenoble sur la cohorte rétrospective constituée de 74 prélèvements..... 47'
Figure 16 : Résultats obtenus par les différents centres pour la recherche des mutations de l'*EGFR* et de *KRAS*, en comparaison aux résultats obtenus par le centre de référence, sur les prélèvements congelés. ..... 48'
Figure 17 : Comparaison des résultats obtenus par le centre de référence à partir des échantillons congelés et inclus en paraffine. ..... 48'
Tableau X : Statut mutationnel de l'*EGFR* et *KRAS* des 17 patients grenoblois inclus dans l'étude prospective. ..... 49'
Figure 18 : Disposition des trois amorces nécessaires pour l'analyse par pyroséquençage..... 51'
Figure 19 : Analyse de la mutation c.2573T>G ; p.Leu858Arg (L588R) de l'exon 21 de l'*EGFR* par pyroséquençage. ..... 65'
Tableau XI : Sensibilité du pyroséquençage pour détecter la mutation L858R de l'exon 21 de l'*EGFR*..... 65
Tableau XII : Statut de l'exon 21 de l'*EGFR* (sauvage ou muté) déterminé par séquençage direct et par pyroséquençage..... 65
Figure 20 : Analyse de la mutation de résistance c.2369C>T ; p.Thr790Met (T790M) et du polymorphisme c.2361G>A ; p.Gln787Gln de l'exon 20 de l'*EGFR* par pyroséquençage..... 66'
Tableau XIII : Sensibilité du pyroséquençage pour détecter la mutation T790M de l'exon 20 de l'*EGFR*..... 66
Figure 21 : Analyse de la délétion LREA de l'exon 19 de l'*EGFR* par pyroséquençage. ..... 67'
Figure 22 : Analyse des produits PCR de l'exon 19 sur gel d'agarose. ..... 67'
Tableau XIV : Statut de l'exon 19 de l'*EGFR* (sauvage ou muté) déterminé par séquençage direct et par pyroséquençage..... 67

ABREVIATIONS

ABREVIATIONS

ACE	Antigène Carcino-Embryonnaire
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AFA	Alcool-Formol-acide Acétique
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
APC	Adenomatosis Polyposis Coli
APS	Adénosine 5' PhosphoSulfate
AR	Amphiréguline
ARMS	Amplified Refractory Mutation System
ARNm	Acide RiboNucléique messager
ASO	Allele Specific Oligonucleotide
ATP	Adénosine TriPhosphate
ATU	Autorisation Temporaire d'Utilisation
BTC	β-celluline
BC	Buffy Coat
CBPC	Carcinomes Bronchiques à Petites Cellules
CBNPC	Carcinomes Bronchiques Non à Petites Cellules
CCD	Charge-Coupled Device
CR	Cystein-Rich
dATPαS	2'-déoxyAdénosine-5'-O-(1-TriPhosphate)
d-HPLC	denaturating High Performance Liquid Chromatography
dNDP	déoxy-Nucléotide DiPhosphate
dNMP	déoxy-Nucléotide MonoPhosphate
dNTP	déoxy-Nucléotide TriPhosphate
ddATP	didéoxy-Adénosine TriPhosphate
ddCTP	didéoxy-CytosineTriPhosphate
ddGTP	didéoxy-Guanosine TriPhosphate
ddNTP	didéoxy-Nucléotide TriPhosphate
ddTTP	didéoxy-Thymidine TriPhosphate
EMEA	European Medicines Agency
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGFRvIII	Epidermal Growth Factor Receptor variant III
EPG	Épigène
EPR	Épiréguline
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluorescence *In Situ* Hybridation
5FU	5-Fluoro-Uracile
GAP	GTPase Activating Proteins
GDP	Guanosine Di-Phosphate
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GTP	Guanosine Tri-Phosphate
Gy	Gray
HB-EGF	Heparine-Binding-EGF
HEG	HexÉthylène Glycol
HER	Human Epidermal growth factor related Receptor

HNPCC	Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer
HRM	High Resolution Melting
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
IARC	International Agency for Research on Cancer
IDEAL	Iressa Dose Evaluation in Advanced Lung cancer
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IgG	Immunoglobuline G
IHC	ImmunoHistoChimie
INCa	Institut National du Cancer
ISEL	Iressa Survival Evaluation in Lung cancer
KO	Knock-Out
MALDI	MAtrix Laser Desorption/Ionization
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
MS	Mass Spectrometry
N-CAM	Neural-Cell Adhesion Molecule
NRG	Neuroréguline
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
pb	Paire de Base
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PI3K	PhospatidylInositol-3-Kinase
PM	Poids Moléculaire
PPi	PyroPhosphate
PTB	PhosphoTyrosine Binding
RDS	Relative Standard Deviation
RFLP	Restriction Fragment Lenght Polymorphism
SH2	Src Homology domain 2
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
STIC	Soutien aux Techniques Innovantes et Coûteuses
TGF-α	Transforming Growth Factor-α
TKI	Inhibiteur de Tyrosine Kinase
TOF	Time-Of-Flight
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VADS	Voies Aéro-Supérieures Digestives
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VEMS	Volume Expiratoire Maximal par Seconde

INTRODUCTION

Introduction

Ce travail a été réalisé au sein de l'Unité Fonctionnelle de Cancérologie Biologique et Biothérapies du Pole de Biologie du CHU de Grenoble. L'unité fonctionnelle est organisée en quatre secteurs : les marqueurs tumoraux circulants, les marqueurs tumoraux cellulaires et moléculaires, les hémoccults et les biothérapies. A ce titre, c'est un des acteurs de la plateforme INCa de génétique moléculaire somatique des cancers avec comme activité la recherche du statut mutationnel des gènes *KRAS* et *EGFR* comme marqueurs moléculaires prédictifs de réponse aux thérapies ciblant le récepteur à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*).

Ce mémoire présente tout d'abord une revue bibliographique décrivant les cancers broncho-pulmonaires, les cancers colorectaux, la famille du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) et son importance dans la carcinogenèse, ainsi que l'intérêt du développement de thérapeutiques ciblant ce récepteur. Un chapitre est également consacré aux marqueurs moléculaires prédictifs de réponse aux thérapies anti-EGFR, ainsi qu'aux différentes techniques utilisables pour les identifier. Les techniques développées au laboratoire, le séquençage direct et le pyroséquençage, font l'objet de la deuxième partie de ce mémoire.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

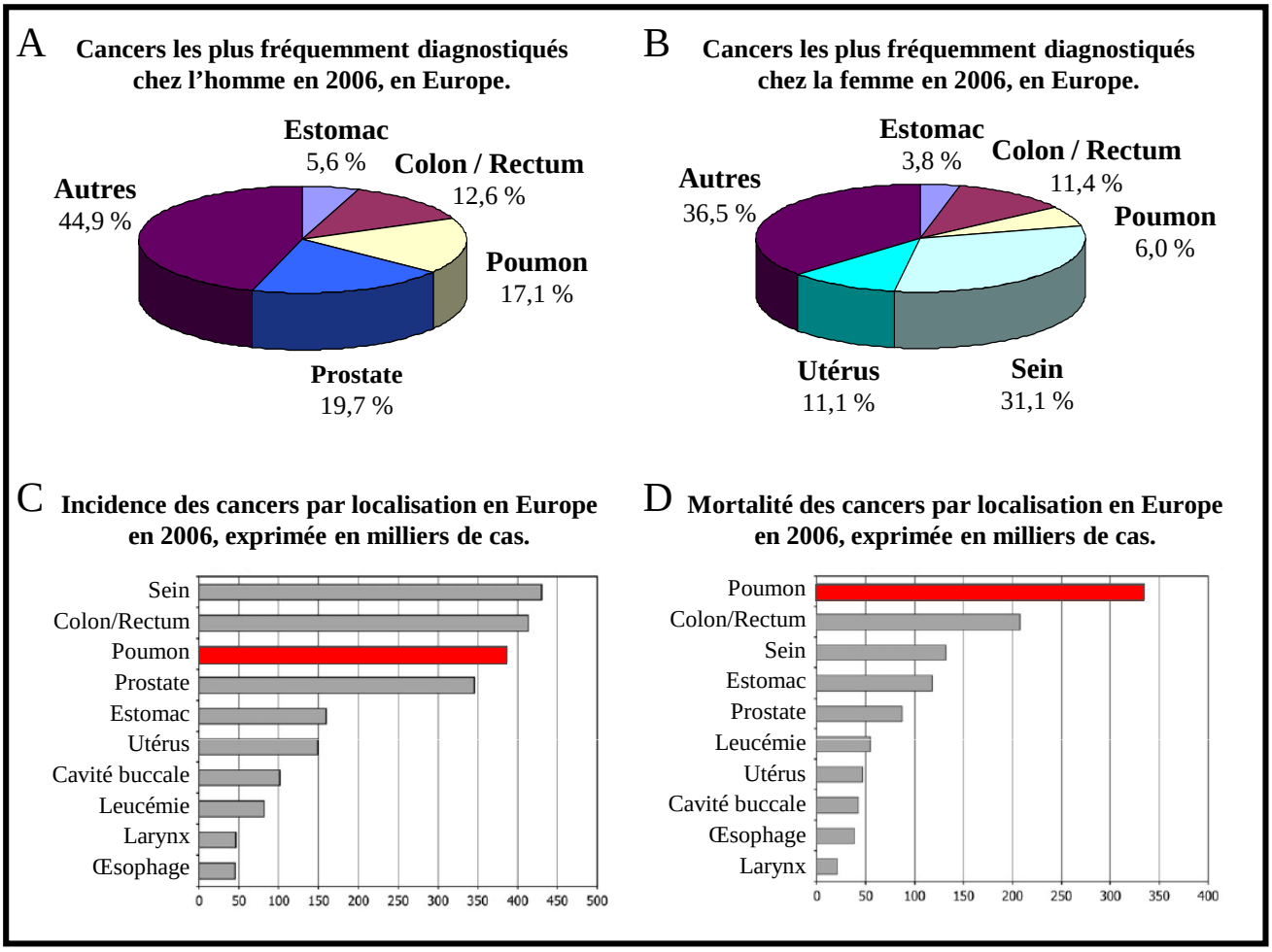


Figure 1. Incidence et mortalité des cancers en Europe en 2006.
Incidence des cancers les plus fréquemment diagnostiqués chez l'homme (A) et chez la femme (B). Incidence (C) et mortalité (D) des cancers, sexes confondus.
D'après Ferlay et coll., 2006.

Première partie : les cancers broncho-pulmonaires

Chapitre 1 : Epidémiologie des cancers broncho-pulmonaires

1 . Données chiffrées

Le cancer broncho-pulmonaire est un problème majeur de santé publique. En Europe, le cancer broncho-pulmonaire est le 3ème cancer le plus fréquemment diagnostiqué (386000 cas, soit 12,1 % de tous les cancers), après le cancer du sein (429 900 cas, soit 13,5 %) et le cancer colorectal (412 900 cas, soit 12,9 %). Malgré une légère diminution de son incidence depuis 2004, il reste la première cause de mortalité par cancer (figure 1) et représente un cinquième des décès par cancer (Ferlay et coll., 2007). Avec 25 000 à 30 000 décès par an en France, les cancers broncho-pulmonaires engendrent plus de décès que ceux induits par les cancers du sein et de la prostate réunis (Hill et Doyon, 2006). Il représente la première cause de décès par cancer chez l'homme et la troisième chez la femme.

Le taux de survie à 5 ans du cancer broncho-pulmonaire reste inférieur à 15 % au niveau mondial (Jemal et coll., 2008), la moyenne européenne n'excédant pas 10 %, toutes histologies et tous stades confondus, ce qui le place au second rang des cancers les plus agressifs après le cancer du pancréas (5 % de survie à 5 ans). Ce mauvais pronostic est étroitement lié au fait que 71 % des patients présentent un cancer de stade avancé (régional ou métastatique) et donc inopérable au moment du diagnostic. Ainsi, 50 % des patients présentant une tumeur localisée, et donc opérable, sont en vie 5 ans après le diagnostic. A l'inverse, moins de 3 % des patients diagnostiqués avec une tumeur métastatique (stade IV) seront encore en vie 5 ans après le diagnostic.

2 . Les facteurs étiologiques

Le tabac est responsable d'environ 75 à 85 % des cancers broncho-pulmonaires. En augmentation jusqu'au milieu des années 1980, l'incidence de ces cancers tend aujourd'hui à diminuer chez l'homme, en lien avec une diminution du tabagisme, mais augmente chez la femme (Eilstein et coll., 2008). La progression de l'incidence observée chez la femme est liée à la consommation accrue de tabac. Le risque de survenue d'un cancer broncho-pulmonaire

est associé à trois facteurs importants liés au tabagisme : le nombre de cigarettes fumées quotidiennement, la durée du tabagisme et l'âge du début du tabagisme (Le Faou et Scemama, 2005). En France, le nombre de fumeurs diminue mais le nombre de grands fumeurs et d'adolescents qui fument augmente, de même que s'abaisse l'âge de la première cigarette. Le risque relatif dépend de la quantité consommée : il passe de 15 pour ½ paquet par jour à 64 pour 2 paquets par jour (risque de 1 pour un non-fumeur). De plus, selon l'étude publiée par Peto et coll. en 2000, un triplement du nombre de cigarettes fumées par jour multiple par trois le risque de développer un cancer broncho-pulmonaire, alors qu'un triplement de la durée du tabagisme multiplie par 100 le risque de cancer. Après arrêt du tabac, le risque relatif diminue exponentiellement pendant la première année pour revenir pratiquement à 1,5 – 2 à partir de 20 ans après le sevrage tabagique (Williams et Sandler, 2001). Il existe également une corrélation entre le développement d'un cancer broncho-pulmonaire et une exposition de longue durée au tabagisme passif, avec un risque relatif évalué à 1,4 (Williams et Sandler, 2001).

Près de 60 substances, présentes dans la fumée de cigarette, sont considérées comme des carcinogènes potentiels, c'est-à-dire des substances capables de provoquer un cancer. Parmi ces substances, nous pouvons citer les benzopyrènes et autres hydrocarbures aromatiques polycycliques, avec le benzo-α-pyrène comme chef de file, les nitrosamines, les phénols, le polonium-210 et l'arsenic.

D'autres facteurs peuvent également accroître le risque de cancer broncho-pulmonaire, notamment l'exposition, dans le cadre professionnel, à des agents toxiques minéraux tels l'amiante, à des métaux tels l'arsenic, le nickel, le chrome ou à des produits à base de pétrole, surtout chez les fumeurs (Alberg et coll., 2005). L'exposition au radon (gaz souterrain) est également un facteur étiologique reconnu chez les mineurs. Enfin, différentes études mentionnent d'autres facteurs de risques tels que la pollution atmosphérique ou une exposition à des radiations ionisantes (Boffetta et coll., 2004).

Il est également vraisemblable qu'un facteur génétique joue un rôle, ce qui pourrait expliquer que des fumeurs ne soient jamais atteints ou que des non-fumeurs le soient. Cela pourrait expliquer le fait que les spécialistes constatent un nombre croissant de cancers du poumon chez des personnes – essentiellement des femmes – qui n'ont jamais fumé et ne côtoient pas de fumeurs (Hung et coll., 2008).

Chapitre 2 : Classifications histologique et pathologique des cancers broncho-pulmonaires

1 . Classification histologique

Le diagnostic est établi à l'aide de la classification histologique internationale des cancers broncho-pulmonaires de l'OMS de 1999, réactualisée en 2004 par l'IARC (Annexe I). Elle est basée sur l'analyse morphologique rigoureuse (macroscopique et microscopique) des lésions selon des critères histologiques simples, reproductibles et donc utilisables par tous les pathologistes. L'intérêt d'une telle classification repose sur la nécessité de délivrer un diagnostic permettant l'inclusion des patients dans des protocoles thérapeutiques et servant de base aux études épidémiologiques et biologiques. Elle permet de répartir 90 % des cancers broncho-pulmonaires en 4 classes d'incidence majeure : les cancers épidermoïdes, les adénocarcinomes, les cancers à petites cellules et les cancers à grandes cellules.
Cependant, en prenant en compte à la fois les critères histologiques et les critères cliniques, deux groupes principaux s'individualisent, notamment en terme de prise en charge thérapeutique : les carcinomes bronchiques à petites cellules (CBPC) et les carcinomes bronchiques non à petites cellules (CBNPC).

1.1 . Les Carcinomes Broncho-pulmonaires à Petites Cellules

Les CBPC représentent 15 à 25 % des carcinomes broncho-pulmonaires et constituent une entité anatomo-clinique bien individualisée, notamment du fait de leur très grande évolutivité locale et métastatique. Liées dans 95 % des cas au tabagisme, ces tumeurs se développent à partir des cellules neuroendocrines, dispersées à l'état normal dans tout l'épithélium bronchique. Elles sont constituées de cellules de petite taille, rondes ou en « grains d'avoine », avec un rapport nucléo/cytoplasmique élevé. Elles expriment toutes au moins un des trois facteurs de différenciation neuroendocrine que sont : la synaptophysine, la chromogranine ou N-CAM (*Neural-Cell Adhesion Molecule*). Ces tumeurs sont très invasives, de haut grade de malignité, avec un index mitotique très élevé et une nécrose tumorale souvent présente et extensive. Les CBPC sont généralement diagnostiqués à un stade avancé et sont traités par chimiothérapie. La chirurgie et la radiothérapie sont inefficaces car l'extension médiastinale est quasi constante et les métastases sont détectables au moment du diagnostic dans deux tiers des cas. Les CBPC sont des carcinomes de très mauvais pronostic,

puisque les médianes de survie sont aux environs de 11 mois pour les formes étendues et de 18 mois pour les formes limitées à l'hémithorax.

1.2 . Les Carcinomes Broncho-pulmonaires Non à Petites Cellules

Cette catégorie de cancers représente 75 à 85 % des cancers broncho-pulmonaires et est composée de sous-types histologiques très différents : les carcinomes malpighiens, les adénocarcinomes et les carcinomes à grandes cellules, ou plus généralement, toute entité ne présentant pas de caractéristique « à petites cellules » (Beasley et coll., 2005). Seules les similitudes de prise en charge thérapeutique justifient leur regroupement au sein d'une même famille.

1.2.1 . Les carcinomes malpighiens

Egalement appelés carcinomes épidermoïdes ou carcinomes squameux, ces tumeurs épithéliales malignes représentent 25 à 35 % des CBNPC. Leur diagnostic est basé sur la présence de kératine synthétisée par les cellules malignes ou « kératinisation » (intra- ou inter-cellulaire) et/ou sur la présence de ponts d'union intercellulaires. Ces tumeurs sont également très corrélées à la consommation de tabac (Spiro et Porter, 2002). Elles sont de différenciation et de grade variables.

1.2.2 . Les adénocarcinomes

Les adénocarcinomes sont des tumeurs épithéliales présentant une différenciation glandulaire ou une sécrétion de mucine par les cellules tumorales. Cette forme histologique, qui représente 40 % des CBNPC, est la plus fréquente de l'homme jeune (moins de 50 ans), de la femme de tout âge et du non-fumeur. Son incidence croissante, notamment en Europe, est en rapport direct avec l'évolution du tabagisme. Les adénocarcinomes broncho-pulmonaires forment un groupe de tumeurs hétérogènes en terme de morphologie, de profil évolutif et d'histogenèse. La classification OMS individualise six sous-groupes : acineux, papillaire, bronchiolo-alvéolaire, solide avec formation de mucines, mixte et un sixième sous-groupe ne comportant que des formes exceptionnelles. A l'exception des carcinomes bronchiolo-alvéolaires (adénocarcinomes présentant une forme non invasive pure) qui ont une grande valeur pronostique avec une survie de 100 % des patients à 5 ans, il n'est pas certain

Susclaviculaire	Scalène (homo-contro-latéral)	Médiastinal (contro-latéral)	Médiastinal (homolatéral)	Sous-carénaire	Hilaire (contro-latéral)	Hilaire (homolatéral)	Péri-bronchique (homolatéral)	GANGLIONS LYMPHATIQUES (N)	
+ /	+ /	+		/	+			N3	Stade III B
-	-	-	+ &/	+	-			N2	Stade III A
-	-	-	-	-	-	+ &/	+	N1	Stade II A / Stade II B
-	-	-	-	-	-	-	-	N0	Stade I A / Stade I B / Stade II B

Stade IV
M1 (quelque soit T, N)

M0

Stade 0
(Tis, N0, M0)

METASTASES (M)

M0 = Absence
M1 = Présence

T1	**T2**	**T3**	**T4**	**TUMEUR PRIMITIVE (T)**
≤ 3 cm	< 3 cm	quelconque	quelconque	Taille
Pas d'invasion à proximité de la bronche lobaire	Bronche souche (≥ 2 cm de la carène)	Bronche souche (< 2 cm de la carène)	-	Localisation endo-bronchique
Entourée par du poumon ou de la plèvre viscérale	Plèvre viscérale	Paroi thoracique / Diaphragme / Plèvre médiastinale / Péricarde pariétal	Médiastin / Trachée / Cœur / Gros vaisseaux / Œsophage / Corps vertébral / Carène	Invasion locale
-	Atelectasie / Pneumonie obstructive s'étendant jusqu'à la région hilaire mais ne concernant pas le poumon entier	Atelectasie / Pneumonie obstructive du poumon entier	Epanchement pleural ou péricardique malin ou nodules tumoraux satellites dans un autre lobe du poumon	Autre

Tis = Carcinone *in situ*

(& = et) (/ = ou) (&/ = et/ou)

Tableau I. Classification pTNM et stadification des tumeurs broncho-pulmonaires.
Classification établie par l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC).
Adapté d'après Lababede et coll., 1999.

que les autres sous-types histologiques aient une quelconque signification clinique ou pathologique.

1.2.3 . Les carcinomes à grandes cellules

Il s'agit essentiellement d'un diagnostic d'exclusion, s'appliquant aux tumeurs n'ayant pas l'aspect d'un cancer broncho-pulmonaire à petites cellules et ne présentant pas de signe de différenciation épidermoïde ou glandulaire. Il s'agit en général de tumeurs périphériques volumineuses. Ces carcinomes représentent 20 % des patients porteurs de CBNPC. Cette famille comprend cinq membres, dont deux ont un impact direct sur le pronostique. Le carcinome neuro-endocrine à grandes cellules et le carcinome basaloïde, qui possèdent respectivement le meilleur pronostic et le plus péjoratif.

2 . Classification pathologique pTNM

Elle constitue la classification d'extension tumorale de référence pour les cliniciens et les pathologistes. De même que la classification histologique, elle représente la base indispensable pour adapter la thérapeutique et pour les études épidémiologiques. Elle permet de définir le stade histopathologique d'extension d'une tumeur (pTNM) après examen macroscopique et microscopique de la pièce de résection par le pathologiste.
La classification TNM est recommandée par l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC), qui a établi la 6ème classification pTNM des cancers bronchiques en 2002 (tableau I). Elle détermine l'extension tumorale en prenant en compte :

T = taille et/ou extension de la **T**umeur primitive
N = présence ou absence de métastase ganglionnaire (ganglions locorégionaux ou « **N**odes »)
M = présence ou absence de **M**étastase(s) à distance

Le stade TNM peut être regroupé en 5 grandes catégories (tableau I) :

- Stade 0 : Carcinome in situ (non invasif)
- Stade I : Invasion très localisée, sans métastase à distance
- Stade II : Extension limitée localement et/ou atteinte ganglionnaire satellite minime
- Stade III : Atteinte locale importante et/ou atteinte ganglionnaire satellite majeure
- Stade IV : Tumeur avec métastase(s)

Chapitre 3 : Prise en charge thérapeutique de CBNPC

Plus de 75 % des cancers broncho-pulmonaires sont des carcinomes bronchiques non à petites cellules (CBNPC) (Blanchon et coll., 2002). Leur traitement, dépendant du type histologique et de la classification pTNM, fait appel à la chirurgie, à la radiothérapie et à la chimiothérapie. La prise en charge thérapeutique de ces carcinomes dépend également de l'extension tumorale, de l'état général et des fonctions respiratoire et cardiaque du malade, qui peuvent contre-indiquer certains traitements, et ainsi contraindre le clinicien à choisir des thérapeutiques alternatives, voire à instaurer un traitement palliatif.

Trois possibilités de traitements sont envisageables selon l'extension de la tumeur :

- Le patient est opérable (stade I, II : N0, N1) : le traitement consiste en une exérèse chirurgicale et la chimiothérapie adjuvante est discutée.
- La tumeur est localement avancée (stade IIIB) : l'association radio-chimiothérapie est recommandée.
- La tumeur est métastatique (stade IV) : c'est en général la plus fréquente (> 60 %). Deux attitudes sont possibles selon l'état général du patient :
    - Si l'état général est peu dégradé et l'amaigrissement faible : le traitement est la chimiothérapie
    - Si l'état général est altéré et l'amaigrissement important : seul un traitement palliatif est mis en place

1 . La chirurgie

La chirurgie est un élément essentiel du traitement des carcinomes broncho-pulmonaires (Shields, 1993). Cependant, elle ne doit être envisagée que dans un but curatif, d'où une extrême rigueur dans les indications.

Actuellement, deux possibilités s'offrent au chirurgien en fonction de l'indication :

- La ***lobectomie*** simple (exérèse d'un lobe pulmonaire) ou élargie, voire la bilobectomie, pour les cancers périphériques de stade N0 ou N1. Les résections limitées à moins d'un lobe sont jugées insuffisantes.

- La ***pneumonectomie*** (exérèse d'un poumon), pour les cancers centraux avec atteinte hilaire ou scissurale, ainsi que pour les cancers périphériques avec dépassement scissural et/ou métastases ganglionnaires hilaires ou scissurales.

Dans tous les cas, un curage ganglionnaire peropératoire est réalisé systématiquement. Les complications de la chirurgie sont importantes (VEMS (Volume expiratoire maximal par seconde) - 20 % dans les lobectomies, - 50 % dans les pneumectomies), voire fatales (1 à 3 % dans les lobectomies ; 5 à 8 % dans les pneumonectomies chez les patients de plus de 70 ans). Ainsi, seul un patient sur quatre sera opéré.

2 . La radiothérapie

La radiothérapie a également prouvé son efficacité dans le traitement des carcinomes broncho-pulmonaires (Dautzenberg et Choukroun, 1998). Différentes indications sont envisageables :

- La radiothérapie exclusive, pour les cancers de stade I et II non opérables et de diamètre inférieur à 5 cm.
- La radiothérapie adjuvante, associée à la chirurgie dans le cas d'une résection incomplète, ou associée à la chimiothérapie pour le traitement des tumeurs inopérables et localement avancées.

La dose administrée doit être au moins égale à 60 Gray (Gy) en cas de lésions macroscopiques (sur la tumeur ou les adénopathies). La radiothérapie se fait classiquement en une séance de 2 Gy par jour, cinq jours par semaine pendant 6 semaines (soit 30 séances). Appliquée aux patients inopérables, non métastasés d'emblée, la survie à 5 ans n'est que de 5 %. Les doses faibles (40 Gy) sont jugées inefficaces.

De nouvelles modalités de radiothérapie ont été développées, notamment : la radiothérapie hyperfractionnée (c'est-à-dire avec plusieurs séances par jour mais avec une moindre irradiation à chaque séance), la radiothérapie en association concomitante à la chimiothérapie. Le but est à chaque fois d'augmenter la dose ou l'effet biologique sur la tumeur et/ou de diminuer les effets secondaires sur le tissu normal.

L'effet secondaire le plus constant est l'oesophagite, suivi par la fibrose pulmonaire des zones irradiées.

3 . La chimiothérapie

3.1 . Les chimiothérapies conventionnelles

La sensibilité à la chimiothérapie varie de manière très importante en fonction du type histologique de la tumeur. Le taux moyen de réponse à la chimiothérapie est de 30 % (Vignot et Besse, 2007). L'usage des drogues cytotoxiques pour le traitement des CBNPC est conditionné par le stade de la maladie, l'état général du patient et la présence éventuelle de comorbidités. Les indications thérapeutiques doivent toujours tenir compte du rapport entre la toxicité et le bénéfice attendu pour le patient.

La monochimiothérapie n'a que peu d'intérêt, mais elle peut être justifiée dans certaines indications. Les protocoles de polychimiothérapies sont les plus fréquemment utilisés. Actuellement, le traitement standard est une bithérapie comprenant un sel de platine (cisplatine (Cisplatyl®) ou carboplatine (Carboplatine®)) et une molécule de 3ème génération. Il s'agira de la vinorelbine (Navelbine®), si une cure de radiothérapie concomitante est prévue, de la gemcitabine (Gemzar®), en absence de radiothérapie, ou du paclitaxel (Paxel®) (Schiller et coll., 2002). Cependant de nombreux protocoles existent (annexe II) et permettent aux cliniciens d'adapter au mieux le traitement.

3.2 . Les thérapies ciblées

Malgré les progrès observés au cours des vingt dernières années dans le traitement de CBNPC, en particulier avec les chimiothérapies à base de sels de platine, les bénéfices en terme de survie dans les formes avancées restent modestes et semblent avoir atteint un plateau. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le processus de transformation néoplasique a focalisé les recherches actuelles sur le développement des thérapeutiques ciblées. Ces traitements sont destinés à cibler de manière sélective un agent responsable de la croissance tumorale, appartenant à la tumeur elle–même, ou à son micro-environnement, afin d'assurer une meilleure sélectivité thérapeutique et donc d'atténuer les effets toxiques sur les tissus sains. L'utilisation de ces nouvelles thérapies permet l'amélioration des taux de réponse et de survie (Vignot et Besse, 2007).

Le bevacizumab (Avastin®), un anticorps monoclonal ciblant le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), a ainsi démontré son efficacité pour le traitement des cancers broncho-pulmonaires avancés en association avec une chimiothérapie par paclitaxel-

carboplatine. Ce traitement améliore la survie sans progression de 30 % et le taux de réponse à la chimiothérapie de 70 %.

Les inhibiteurs du récepteur à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) sont également utilisés en 2ème ou 3ème ligne de traitement. La troisième partie de cette introduction est consacrée à ce récepteur, dont le ciblage thérapeutique a démontré dès 2005, un bénéfice de survie des CBNPC en 2ème ligne (Shepherd et coll., 2005).

Deuxième partie : les cancers colorectaux

Chapitre 1 : Epidémiologie des cancers colorectaux

1 . Données chiffrées

En France, le cancer colorectal est actuellement le plus fréquent, sexes confondus, bien que les hommes soient plus atteints que les femmes. Il représente 15 % des cas de cancers diagnostiqués chaque année.

En 2003, on estimait à 36 200 le nombre de nouveaux cas et à 16 000 le nombre de décès en France (Remontet et coll., 2003). En terme d'incidence, il se situe au troisième rang des cancers, après le cancer du poumon et le cancer de la prostate chez l'homme, et après le cancer du poumon et le cancer du sein chez la femme. L'incidence de ce cancer a augmenté régulièrement jusqu'en 1990 et tend actuellement à se stabiliser, tandis que la mortalité décroît. Il reste toutefois le deuxième cancer en terme de mortalité derrière le cancer broncho-pulmonaire, et devance la mortalité par cancer du sein et par cancer de la prostate.

La survie relative à 5 ans est de 55 % (tous stades confondus). En France, la survie à 5 ans s'est améliorée d'environ 20 % en 20 ans, passant de 33 % à 55 % (Sant et coll., 2002). Cette amélioration est principalement liée au diagnostic plus fréquent de la maladie à un stade précoce (stades I/II de 39,6 % à 56,6 %) et à l'amélioration de la prise en charge chirurgicale initiale (diminution de la mortalité postopératoire). La survie dépend étroitement du stade de la maladie au moment du diagnostic. Une étude a ainsi montré que la survie relative à 5 ans pour une personne diagnostiquée au stade I, c'est-à-dire le plus précoce, est de 94 %. Il est donc important de mettre en place des campagnes de dépistage et de pouvoir, si une anomalie est détectée, la prendre en charge le plus tôt possible.

En ce qui concerne la localisation, environ 40 % des cancers touchent le rectum et 60 % le colon, où la localisation principale est le sigmoïde. La majorité des cancers coliques touchent donc la dernière partie du colon.

La France métropolitaine se situe parmi les régions à risque élevé, tout comme les autres pays d'Europe de l'Ouest, les Etats-Unis, l'Australie et, plus récemment, le Japon. Ce cancer est beaucoup plus rare en Amérique du Sud, en Asie et surtout en Afrique.

Niveau de certitude	Risque diminué	Pas de relation	Risque accru
Probable	Activité physique Légumes		Viande rouge Alcool
Possible	Fibres alimentaires (= polysaccharides autres que l'amidon) Amidon Caroténoïdes	Calcium Sélénium Poisson	Masse corporelle élevée Taille adulte plus élevée Repas fréquents Sucre Graisses totales Graisse saturée / animale Viande préparée / très cuite Œufs Tabac
Insuffisant	Amidons non digestibles Vitamines C, D, E Folates Méthionine Céréales Café		Fer

Tableau II. Alimentation et cancer colorectal : facteurs de risque et de protection, par niveaux de certitude.
Bien qu'un caractère héréditaire ait pu être décrit dans certains cas, les principaux facteurs de risque concernant le cancer colorectal relèvent essentiellement des modes de vie. En effet, les habitudes alimentaires sont le plus souvent en relation avec l'augmentation significative des cas de cancers colorectaux.

2 . Les facteurs étiologiques

Plus qu'un facteur de risque, le polype adénomateux, également appelé adénome, est considéré comme la lésion précédant l'adénocarcinome. En effet, dans 60 à 80 % des cas de cancer colorectal, un reliquat de polype adénomateux est retrouvé. Son risque de transformation dépend de la taille, du degré de dysplasie et de l'importance de la composante villeuse. Ainsi, des différents types de polypes adénomateux, l'adénome villeux (5 % des polypes) est celui qui a le plus de risque de se transformer en cancer. Les adénomes de plus de 1 cm de diamètre et/ou comportant une composante villeuse et/ou en dysplasie sévère, sont considérés comme des lésions à haut grade de transformation maligne (Benhamiche-Bouvier et coll., 2000). La détection et l'exérèse des polypes adénomateux permettent donc de réduire le risque de cancer colorectal.

D'autres part, le facteur génétique est en cause dans deux formes de cancers colorectaux : la polyadénomatose recto-colique familiale qui est caractérisée par une mutation du gène *APC* et le syndrome de Lynch (cancers colorectaux héréditaires sans polypose) caractérisé par des anomalies sur des gènes codant pour les protéines de réparation de l'ADN. Ces cancers héréditaires représentent moins de 10 % de l'ensemble des cancers colorectaux et surviennent avant 40 ans.

Le risque est également accru chez les personnes ayant un antécédent personnel ou familial (parent du 1er degré) d'adénome ou de cancer colorectal ou chez les personnes souffrant de maladies inflammatoires (maladie inflammatoire de l'intestin, maladie de Crohn ou rectocolite ulcéro-hémorragique). Les cancers sur colites inflammatoires représentent 1 % des cancers colorectaux.

Le mode de vie et l'alimentation peuvent influencer le développement du cancer colorectal. Ainsi, l'activité physique joue un rôle protecteur (Bouton-Ruault et coll., 2001). De plus, les résultats de plusieurs études convergent à propos de l'effet protecteur des légumes verts, des fruits frais et des fibres alimentaires et sur l'excès de risque entraîné par une alimentation trop riche en graisses. Il persiste cependant de nombreuses divergences sur le rôle des autres facteurs alimentaires (tableau II). Le rôle de l'alcool et du tabac est encore imprécis. Cependant différentes études semblent suggérer que le tabac favorise l'apparition des adénomes et que l'alcool favorise leur augmentation de taille (Brouton et coll., 1995).

Chapitre 2 : Dépistage et diagnostic des cancers colorectaux

1 . Le dépistage des cancers colorectaux

Le dépistage organisé du cancer colorectal repose sur la recherche d'un saignement occulte dans les selles (test Hemoccult II®) chez les personnes de 50-74 ans, tous les deux ans. Ce programme de dépistage organisé a été initié par les pouvoirs publics à partir de 2002.
En pratique, les structures de gestion invitent par courrier les personnes âgées de 50 à 74 ans à se rendre chez leur médecin généraliste pour se faire expliquer la démarche. Le médecin détermine alors si le test est approprié à la situation de son patient et dans l'affirmative, lui remet le test après avoir expliqué les modalités d'utilisation.
En cas de test négatif (97 % des cas), la personne est invitée à renouveler ce dépistage deux ans plus tard. Elle est également sensibilisée aux signaux d'alerte devant la conduire à consulter son médecin sans attendre ce délai de deux ans.
En cas de test positif, le médecin traitant prescrit une coloscopie pour confirmer ou infirmer la présence d'anomalies dans le colon ou le rectum. La coloscopie permet en outre de retirer d'éventuels polypes. Elle se fait sous anesthésie générale.

Chez les sujets à haut risque (existence d'antécédents familiaux notamment) ou à très haut risque (polypose adénomateuse familiale ou syndrome de Lynch), une coloscopie est proposée d'emblée, généralement avant 50 ans, parfois même dès l'âge de 20 ans.

Le dépistage du cancer colorectal permet de détecter précocement d'éventuelles anomalies avant même qu'elles ne deviennent cancéreuses, ce qui facilite le traitement et augmente les chances de guérison. Les experts estiment que le dépistage organisé pourrait réduire la mortalité liée à ce cancer de 15 à 20 %, à partir du moment où la participation au dépistage organisé atteint 50 %.

2 . Le diagnostic des cancers colorectaux

Le diagnostic du cancer du colon repose sur la coloscopie totale, qui permet de visualiser la tumeur et de réaliser des biopsies. Le diagnostic du cancer du rectum, plus accessible à l'examen clinique (toucher rectal), est fait par rectoscopie qui permet également

de réaliser des biopsies. Cet examen doit être complété par une coloscopie et, si elle n'est pas possible, par un examen radiologique (lavement baryté).

Les métastases viscérales compliquent l'évolution de 60 à 70 % des cancers colorectaux. Les métastases les plus fréquentes atteignent le foie, les ganglions intra-abdominaux, le péritoine et le poumon. Ainsi, la réalisation d'examens complémentaires, tels que le dosage de l'antigène carcino-embryonnaire (ACE), une radiographie pulmonaire, une échographie hépatique et éventuellement un scanner abdominal permet l'identification des formes métastatiques.

	T – Tumeur primitive
TX	Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive
TO	Pas de signe de tumeur primitive
Tis	Carcinome *in situ* : tumeur intra-épithéliale ou envahissant la muqueuse[1]
T1	Tumeur envahissant la sous-muqueuse
T2	Tumeur envahissant la musculeuse
T3	Tumeur envahissant à travers la musculeuse, la sous-séreuse et les péricoliques et périrectaux extrapéritonéaux
T4	Tumeur perforant le péritoine viscéral ou envahissant directement les autres organes ou les autres strucutures [2,3]
	N – Adénopathies régionales
NX	Renseignements insuffisants pour classer les adénopathies régionales
N0	Pas d'adénopathies
N1	Présence d'une à trois adénopathies péricoliques métastatiques
N2	Présence de quatre, ou plus, adénopathies péricoliques métastatiques
N3	Présence d'adénopathies centrales (au niveau des troncs vasculaires) métastatiques
	M – Métastases à distance
MX	Renseignements insuffisants pour classer les métastases à distance
M0	Pas de métastase à distance
M1	Présence de métastase(s) à distance

Tableau III. Classification TNM de tumeurs colorectales.
Classification établie par l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC), applicable uniquement aux carcinomes.
[1] Tis comporte les cas de cellules cancéreuses localisées dans la membrane basale glandulaire (intra-épithéliale) ou dans la muqueuse (intramuqueuse) sans extension à travers la muqueuse musculaire à la sous-muqueuse.
[2] L'invasion directe du T4 comprend l'invasion des autres segments du colo-rectum par le chemin de la séreuse : par exemple l'invasion du colon sigmoïde par un carcinome du caecum.
[3] Une tumeur qui est adhérente macroscopiquement à d'autres organes ou structures est classée T4. Toutefois, si microscopiquement aucune tumeur n'est présente dans la zone d'adhésion, elle est classée T3.

Chapitre 3 : Classifications histologique et pathologique des cancers colorectaux

1 . Classification histologique selon l'OMS

Dans la majorité des cas (90 %), les cancers du colon et du rectum sont des adénocarcinomes, dont les variétés histologiques ont peu d'influence sur le pronostic. Morphologiquement, les cancers du colon et du rectum présentent peu de différences. Ils sont généralement découverts à un stade avancé.

Selon la classification de l'OMS, les cancers colorectaux peuvent être divisé en 2 groupes selon leur histologie : les adénocarcinomes ou « formes communes » et les formes histologiques particulières.

1.1 . Les adénocarcinomes

Dans 80 % des cas, les adénocarcinomes sont de type lieberkühnien, en fonction de leur degré de ressemblance avec les glandes de lieberkühn de la muqueuse colique normale. Ils peuvent être plus ou moins différenciés (bien, moyennement ou peu différencié). Souvent la tumeur comporte des territoires plus ou moins bien différenciés. Ainsi, pour la caractériser, le pathologiste doit prendre en compte l'aspect le plus indifférencié, mais en éliminant la zone d'invasion périphérique ainsi que les zones proches d'une ulcération. Ces tumeurs présentent souvent de vastes plages de nécroses riches en polynucléaires.

Dans 10 % des cas, les adénocarcinomes sont de type mucineux ou colloïde muqueux. Dans cette forme, plus de 50 % de la surface de la coupe est constituée par de la mucine, ce qui leur donne un aspect gélatineux. Le pronostic des adénocarcinomes mucineux est un peu moins bon que celui des adénocarcinomes lieberkühnien.

1.2 . Les formes histologiques particulières

Dans cette catégorie, sont classés : les carcinomes en bague à chaton, les carcinomes épidermoïdes, les carcinomes adénosquameux et les carcinomes indifférenciés.

Le ***carcinome en bague à chaton*** est une forme histologique pour laquelle plus de 50 % des cellules tumorales sont indépendantes et présentent une gouttelette de mucus

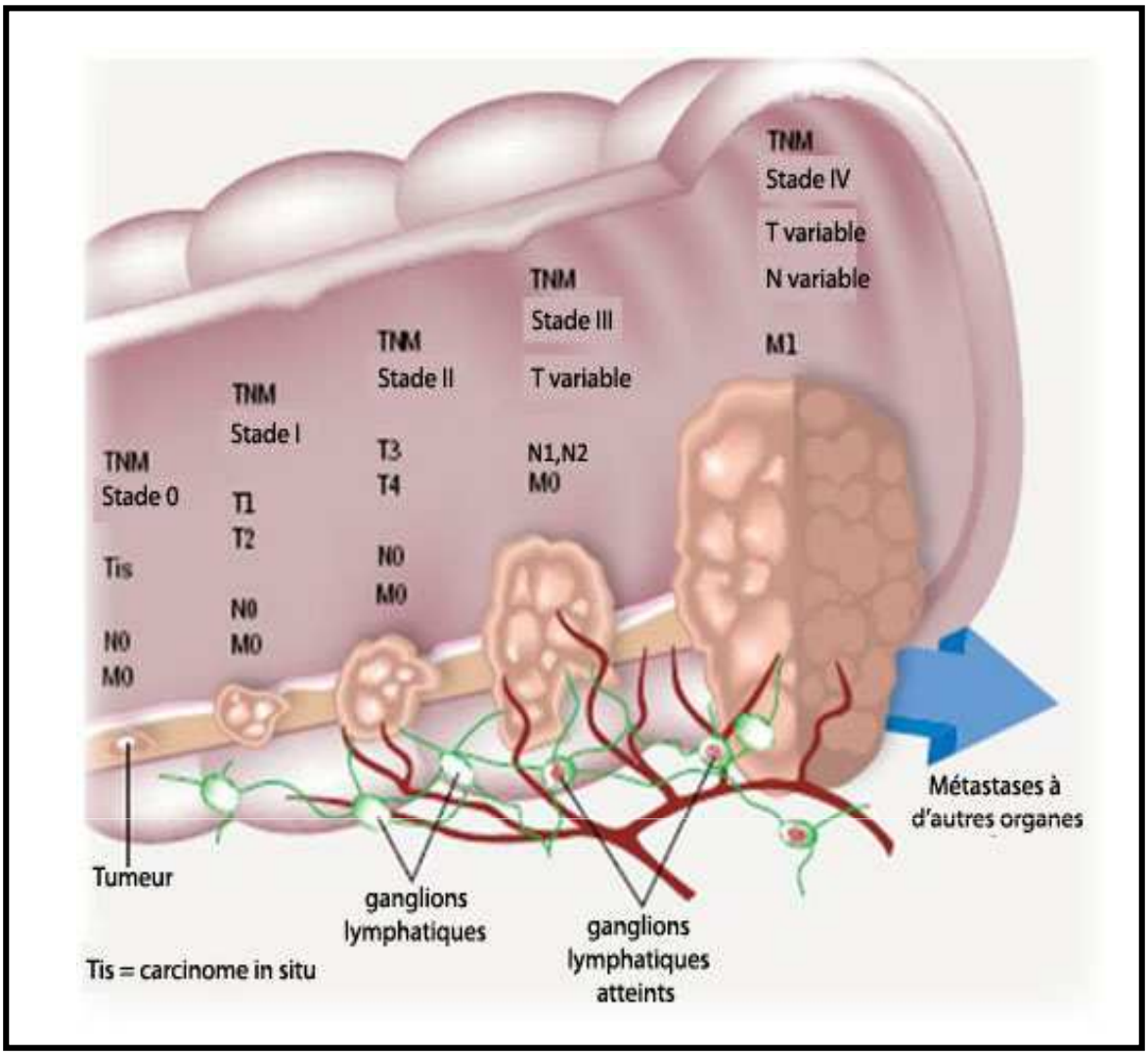


Figure 2. Stadification des tumeurs colorectales.
Stade 0 : Le cancer ne touche que la première couche de la paroi interne du colon ou du rectum, sans envahissement de l'ensemble de la paroi abdominale (Tis).
Stade I : Le cancer a traversé plusieurs couches de la paroi du colon et du rectum (T1 N0M0, T2 N0M0).
Stade II : Le cancer a franchi complètement la paroi du colon ou du rectum et peut se propager aux tissus environnants (T3 N0M0, T4 N0M0).
Stade III : Le cancer a atteint les ganglions lymphatiques (Quel que soit le T, N1-N2-N3, M0).
Stade IV : Présence de métastases à distance, généralement localisées au niveau du foie ou des poumons (Quel que soit le T ou le N, M0).
(Correspondance avec la classification pTNM)

intracytoplasmique. Cette forme est rarement primitive du colon et doit faire rechercher un éventuel carcinome gastrique à cellules en bague à chaton. Ce carcinome est généralement découvert à un stade avancé, diffuse dans le péritoine et dans les ganglions pelviens, mais ne donne qu'occasionnellement des métastases hépatiques.

Les ***carcinomes épidermoïdes*** sont rares et constitués exclusivement de cellules malpighiennes. Ils sont de mauvais pronostic.

Les ***carcinomes adénosquameux*** contiennent de nombreux foyers malpighiens. Leur pronostic est également moins bon que celui des adénocarcinomes.

2 . Classification pathologique pTNM

La classification TNM est recommandée par l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC). Elle détermine l'extension tumorale au niveau de la tumeur primitive (T), des adénopathies régionales (N) et des métastases à distance (M).

Le stade d'un cancer colorectal correspond donc à l'importance de son étendue, qui est définie en fonction de l'invasion tumorale dans la paroi intestinale, de l'atteinte des ganglions lymphatiques et de la présence de métastases (tableau III). Une fois définie l'atteinte de chaque élément, le pathologiste combine les résultats afin de déterminer le stade global du cancer (figure 2).

Le stade TNM peut être regroupé en 5 grandes catégories :

- Stade 0 : Carcinome in situ (non invasif)
- Stade I : Invasion très localisée, sans métastase à distance
- Stade II : Extension limitée localement et/ou atteinte ganglionnaire satellite minime
- Stade III : Atteinte locale importante et/ou atteinte ganglionnaire satellite majeure
- Stade IV : Tumeur avec métastase(s)

Le stade de dissémination des tumeurs représente un facteur pronostique important auquel la survie des patients a pu être directement corrélée. Les chiffres actuels de survie à 5 ans sont ainsi de l'ordre de 80-95 % pour les patients atteints d'un cancer colorectal de stade I, de 60-80 % pour les stades II, de 30-50 % pour les stades III et de 5 % pour les stades IV.

Chapitre 4 : Prise en charge thérapeutique des cancers colorectaux

La chirurgie constitue la base du traitement des cancers colorectaux. Sauf exception, la radiothérapie et la chimiothérapie ne constituent en la matière que des traitements adjuvants à la chirurgie.

1 . La chirurgie

L'intervention chirurgicale est un geste obligatoire pour le traitement des cancers colorectaux permettant l'exérèse de la tumeur et un curage ganglionnaire. L'intervention chirurgicale est le plus souvent une laparotomie médiane. Pour être suffisante, l'exérèse doit emporter au moins 5 cm de colon de part et d'autre des lésions cancéreuses. En fonction de la localisation tumorale, plusieurs interventions peuvent être réalisées :

- une hémicolectomie,
- une résection du colon transverse,
- une recto-sigmoïdectomie.

Pour la plupart des patients, les parties restantes du colon ou de l'intestin peuvent être réunies, ce qui permet un fonctionnement normal de l'intestin. Dans certains stades plus avancés, l'intestin ne peut pas être reconnecté et une colostomie est nécessaire.

S'il y a découverte de métastases hépatiques pendant la chirurgie d'un cancer du colon, la résection peut être envisagée : de façon synchrone si l'exérèse apparaît facile, de façon métachrone en cas de métastases multiples. Des études récentes ont montré que la taille et le nombre de lésions avaient peu d'influence sur la survie après chirurgie. Certaines techniques comme l'échographie préopératoire, la chimiothérapie néoadjuvante (avant la chirurgie hépatique) ainsi que l'embolisation de la branche de la veine porte du segment atteint, la radiofréquence, permettent d'augmenter le nombre de patients opérables de leurs métastases et la précision du geste chirurgical.

Il faut noter que sur 100 patients atteints de cancers colorectaux, 15 à 20 présentent des métastases hépatiques synchrones et 20 présenteront des métastases hépatiques métachrones dans les 5 ans suivant le diagnostic initial. La chirurgie des localisations

secondaires hépatiques constitue une stratégie curative permettant une guérison définitive dans 25 % des cas.

Actuellement, la chirurgie par coelioscopie est une alternative assez fréquente à la chirurgie classique. Elle offre la même sécurité et améliore la qualité de vie des patients (réduction de la douleur post-opératoire, de la durée d'hospitalisation, cicatrices discrètes et risque réduits d'éventration).

Dans le cas où la tumeur n'est pas résécable, le patient sera traité au moyen d'une chimiothérapie systémique, qui permet une amélioration sa qualité de cette vie et, dans certains cas, peut réduire les tumeurs jusqu'à ce qu'elles deviennent résécables.

2 . La radiothérapie

Dans le cadre des cancers du colon, la radiothérapie externe transcutanée présente une efficacité locale et régionale médiocre, et ne trouve d'indication que pour les formes tumorales T3/T4 présentant un risque substantiel de récidives locorégionales extraluminales qui sont systématiquement létales.

A l'inverse les cancers du rectum présentent un risque substantiel de récidive locorégionale, notamment lorsque la tumeur siège dans la partie sous-péritonéale du rectum. La radiothérapie constitue alors le moyen le plus efficace de réduire ce risque qui atteint 10 à 15 % pour les formes sous-péritonéales même après exérèse correcte du mésorectum.

La dose habituelle administrée est de 45 à 55 Grays, sur 5 à 6 semaines, généralement en peropératoire pour éviter les complications classiques de l'irradiation. Cette dose est suffisante pour contrôler les micro-agrégats cellulaires métastatiques régionaux. Ainsi, le taux de récidives pelviennes diminue de moitié par rapport à la chirurgie seule. Cependant, la radiothérapie n'a pas d'impact sur la survie globale.

Dans certains cas particuliers, la radiothérapie est utilisée de manière exclusive par voie endocavitaire (curiethérapie ou radiothérapie de « contact ») pour le traitement de petites lésions bien différenciées du bas rectum.

Les effets secondaires de la radiothérapie sont variables selon les patients. Les plus fréquentes sont la rougeur de la peau, la cystite radique et les troubles de l'érection.

3 . La chimiothérapie

L'objectif de ce traitement adjuvant est la prévention et/ou le traitement des micrométastases régionales et à distance. Les indications de la chimiothérapie dépendent des conditions générales propres au patient (âge, état général, pathologies associées) et des données pronostiques fournies par l'examen anatomopathologique.

3.1 . Molécules anti-tumorales conventionnelles

Le 5-fluoro-uracile ou 5FU a longtemps été la seule molécule active à la fois pour le traitement des cancers coliques métastatiques et pour les traitements adjuvants. Le 5FU est un inhibiteur de la thymidylate synthétase et donc de la synthèse de l'ADN. Il a ensuite été utilisé en combinaison avec des immuno-modulateurs qui permettent d'augmenter l'anabolisme du 5FU, de favoriser son incorporation dans les acides nucléiques et donc de potentialiser son effet sur sa cible.

Le 5FU est actuellement utilisé en association avec l'acide folinique, l'irinotécan (Campto®) ou l'oxaliplatine (Eloxatine®). De nombreuses combinaisons existent (Annexe III) afin de mieux adapter le traitement. Les combinaisons les plus fréquemment utilisées sont FOLFOX (5-FU, leucovorine, oxaliplatine) et FOLFIRI (5-FU, leucovorine, irinotécan), qui constituent le traitement standard des stades IV. Ces combinaisons sont également proposées pour le traitement des stades III. Ses principales complications sont d'ordre hématologique (neutropénie surtout), digestif (mucite ou diarrhée) et beaucoup plus rarement cardiaque (spasmes coronariens).

La Capécitabine (Xeloda®), une prodrogue du 5FU, est plus active que le 5FU et engendre moins de neutropénies fébriles. En combinaison avec l'oxaliplatine, la capécitabine reste peu toxique et constitue le traitement standard des stades III, avec l'association 5FU – irinotécan.

Pour les stades II, la chimiothérapie adjuvante est une option pour des patients présentant des caractéristiques histologiques péjoratives, mais elle n'est pas un standard. En effet, elle ne présente qu'un faible bénéfice sur la survie globale à 5 ans, de l'ordre de 2 à 5 %.

Dans le cas des cancers rectaux, l'efficacité de la chimiothérapie adjuvante post-opératoire n'a pas été démontrée, ni en terme de prévention de l'évolution métastatique, ni en terme d'amélioration de la survie globale. Cependant, en association avec la radiothérapie, elle réduit les taux de récidives locales.

3.2 . Thérapies ciblées

De la même manière que pour les cancers broncho-pulmonaires, les thérapeutiques ciblées sont utilisées pour le traitement des cancers colorectaux. Ainsi, le bevacizumab (Avastin®), anticorps anti-facteur de croissance endothéliale (VEGF), ou le cetuximab (Erbitux®), anticorps anti-récepteur au facteur de croissance épithéliale (EGFR), qui étaient initialement utilisés pour le traitement des formes métastatiques, sont aujourd'hui testés dans différentes études en prescription adjuvante.

Le bevacizumab est habituellement combiné avec une association de chimiothérapie (paclitaxel-carboplatine, par exemple). Ce traitement améliore la survie sans progression de 39 % et le taux de réponse à la chimiothérapie de 70 %.

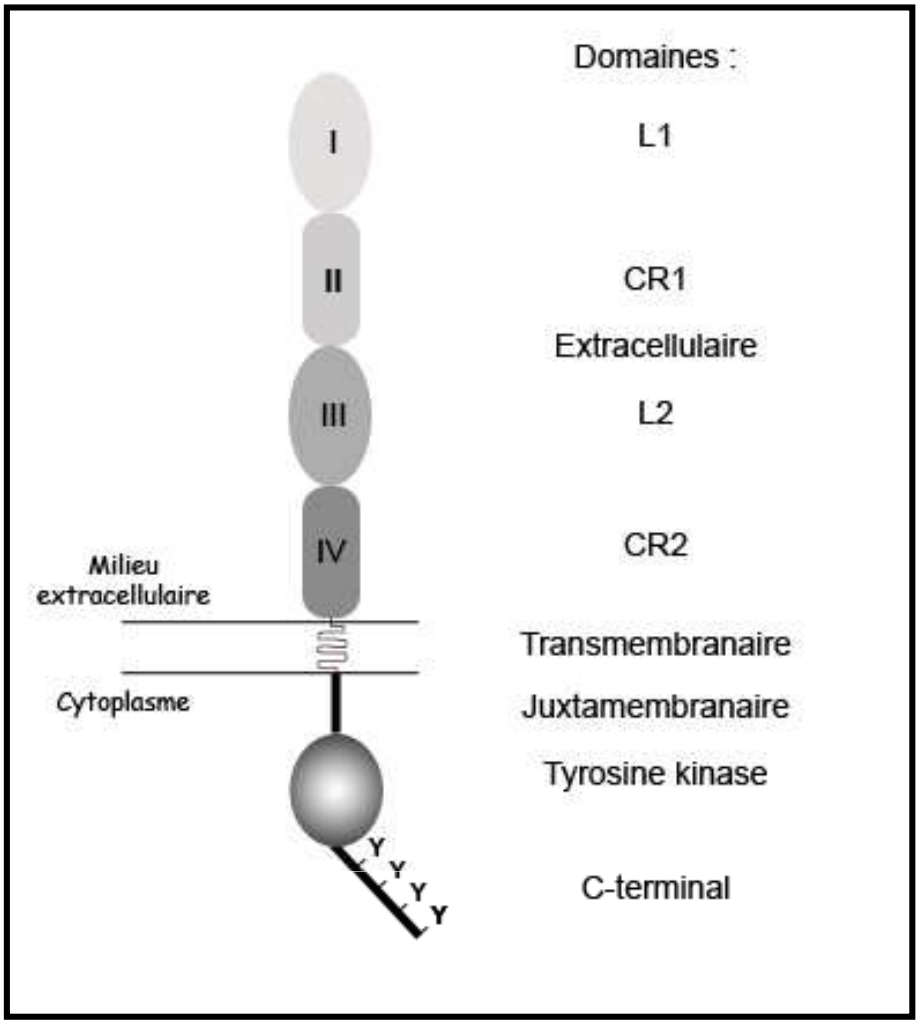


Figure 3. Structure schématique des récepteurs de la famille HER.
La partie extracellulaire (~ 620 acides aminés) est composée de 4 domaines, homologues 2 à 2, appelés L1 et L2 (domaines I et III, siège de la fixation du ligand) et CR1 et CR2 (pour *Cystein Rich*, domaines II et IV). Suivent ensuite le domaine transmembranaire (~ 23 aa), le domaine juxtamembranaire (~ 45 aa), le domaine tyrosine kinase (~ 260 aa), et un domaine C-terminal (de 230 à 380 aa) qui peut être phosphorylé au niveau de tyrosines (Y).
D'après Holbro et Hynes, 2004.

Troisième partie : Du récepteur à l'EGF aux thérapies ciblées

Chapitre 1 : Le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR)

1 . La famille de l'EGFR

Le récepteur à l'EGF (EGFR), glycoprotéine transmembranaire de 170 kDaltons, est le prototype de la famille des récepteurs à tyrosine kinase. Cette famille HER (*Human Epidermal growth factor Receptor*), également nommée Erb-B (d'après leur analogie avec un oncogène d'un virus d'érythoblastose aviaire), comprend quatre membres : HER1 (EGFR ou Erb-B1,), HER2 (Erb-B2ou HER2/Neu), HER3 (Erb-B3) et HER4 (Erb-B4). Ces récepteurs jouent un rôle très important dans la croissance, la différenciation et le métabolisme cellulaire.

1.1 . Structure des récepteurs

L'ensemble des membres de la famille HER présente une grande homologie de structure primaire (40 à 50 %), se traduisant par une organisation structurale caractéristique (figure 3). Les récepteurs de cette famille possèdent donc des structures globales proches comprenant un domaine extracellulaire (~ 620 acides aminés) liant le ligand. Ce domaine extracellulaire est composé de 4 sous-domaines (I à IV) répétés 2 à 2, se succédant en alternance. Les domaines I et III sont très semblables et analogues à un domaine du récepteur de l'*Insulin-like Growth Factor* (IGF-1), un autre récepteur à activité tyrosine kinase. Ces deux domaines ont été identifiés comme étant le siège de la fixation du ligand, d'où leur dénomination L1 et L3. Les domaines II et IV sont eux, caractérisés par l'abondance en résidus cystéine, d'où leur appellation CR1 et CR2 (CR : *Cystein-Rich*). La région transmembranaire (23 acides aminés) est caractérisée par sa grande hydrophobicité, qui permet l'ancrage du récepteur dans la membrane plasmique. Le troisième domaine du récepteur est un domaine intracellulaire de 542 acides aminés. Il est composé d'un domaine juxtamembranaire (~ 45 acides aminés) dont le rôle n'est pas entièrement élucidé, et d'un domaine à activité tyrosine kinase, dont la séquence est très conservée entre les quatre gènes

Facteurs de croissance	Récepteurs connus	Récepteurs hétérodimérisés
EGF (*Epidermal Growth Factor*)	EGFR	HER 1+2, 1+3, 1+4
Amphiréguline (AR)	EGFR	HER 1+2, 1+3, 1+4
TGFα (*Transforming Growth Factor alpha*)	EGFR	HER 1+2, 1+3, 1+4
Epigène (EPG)	EGFR	HER 1+2, 2+4
ℜ-celluline (BTC)	EGFR, HER4	HER 1+2, 2+4
HB-EGF (*heparin-binding EGF*)	EGFR, HER4	HER 1+2, 1+3, 1+4, 2+4
Epiréguline (EPR)	EGFR, HER4	HER 1+2, 2+4
Neurégulines (NRG) (4 gènes, nombreuses isoformes)	HER3, HER4	HER 1+3, 1+4, 2+3, 2+4, 3+4
Récepteurs	**Ligands reconnus**	**Année de découverte**
EGFR (*EGF receptor*) = HER1 = ErbB1	Tous sauf NRG	1978, cloné en 1984
HER2= ErbB2 = *neu* (oncogène de rat)	Aucun	Cloné en 1985
HER3 = ErbB3	NRG 1et 2	Cloné en 1989
HER4 = ErbB4	BTC, HB-EGF, EPR, NRG1 à 4	Cloné en 1993

Tableau IV. Les facteurs de croissance analogues à l'EGF et leurs récepteurs.
D'après Holbro et Hynes, 2004.

des récepteurs de la famille HER (59 à 81 % d'homologie). Ce domaine est également très conservé pour les tyrosines kinases solubles et les protéines- et lipides-kinases en général. Le segment régulateur C-terminal (230 à 380 acides aminés), riche en sites de phosphorylation, est très important pour la transduction du signal car l'activité du domaine tyrosine kinase nécessite la fixation d'un phosphore sur un des sites majeurs d'autophosphorylation. Il est beaucoup moins bien conservé.

1.2 . Les ligands des récepteurs de la famille EGFR

L'EGFR est le membre de la famille HER le mieux caractérisé et pour lequel de nombreux ligands ont été identifiés. Les ligands de type EGF sont classés en trois catégories selon leur sélectivité pour les récepteurs (tableau IV). Le premier groupe comprend les ligands se liant spécifiquement à l'EGFR : l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), le TGF-α (*Transforming Growth Factor-α*), l'amphiréguline (AR) et l'épigène (EPG). Le second groupe comprend la β-celluline (BTC), l'HB-EGF (*Heparine-Binding*-EGF) et l'épiréguline (EPR), capables de se lier spécifiquement à l'EGFR et à HER4. Le troisième, composé des neurorégulines (NRGs), est divisé en deux sous-groupes selon qu'elles soient capables de se lier à HER3 et HER4 (NRG-1 et NRG-2) ou seulement à HER4 (NRG-3 et NRG-4) (Kochupurakkal et coll., 2005).

Les récepteurs HER2 et HER3 présentent deux particularités : HER2 n'a pas de ligand connu, tandis que HER3 n'a pas de fonction tyrosine kinase (ou une très faible) et n'a d'activité biologique qu'en combinaison avec d'autres récepteurs de la famille HER (Citri et coll., 2003). Ces caractéristiques étonnantes pour des récepteurs les ont fait surnommer le « sourd » (HER2) et le « muet » (HER3).

2 . Activation de l'EGFR et voies de signalisation

Le principe général d'activation des récepteurs HER est lié à une dimérisation du récepteur en présence de son ligand. En effet, en l'absence de ligand, ces récepteurs sont sous la forme de monomères inactifs. La fixation d'un ligand va permettre l'association de deux monomères en un dimère actif. Ces dimères actifs peuvent être des homodimères, associant deux monomères identiques, ou des hétérodimères composés de deux monomères différents.

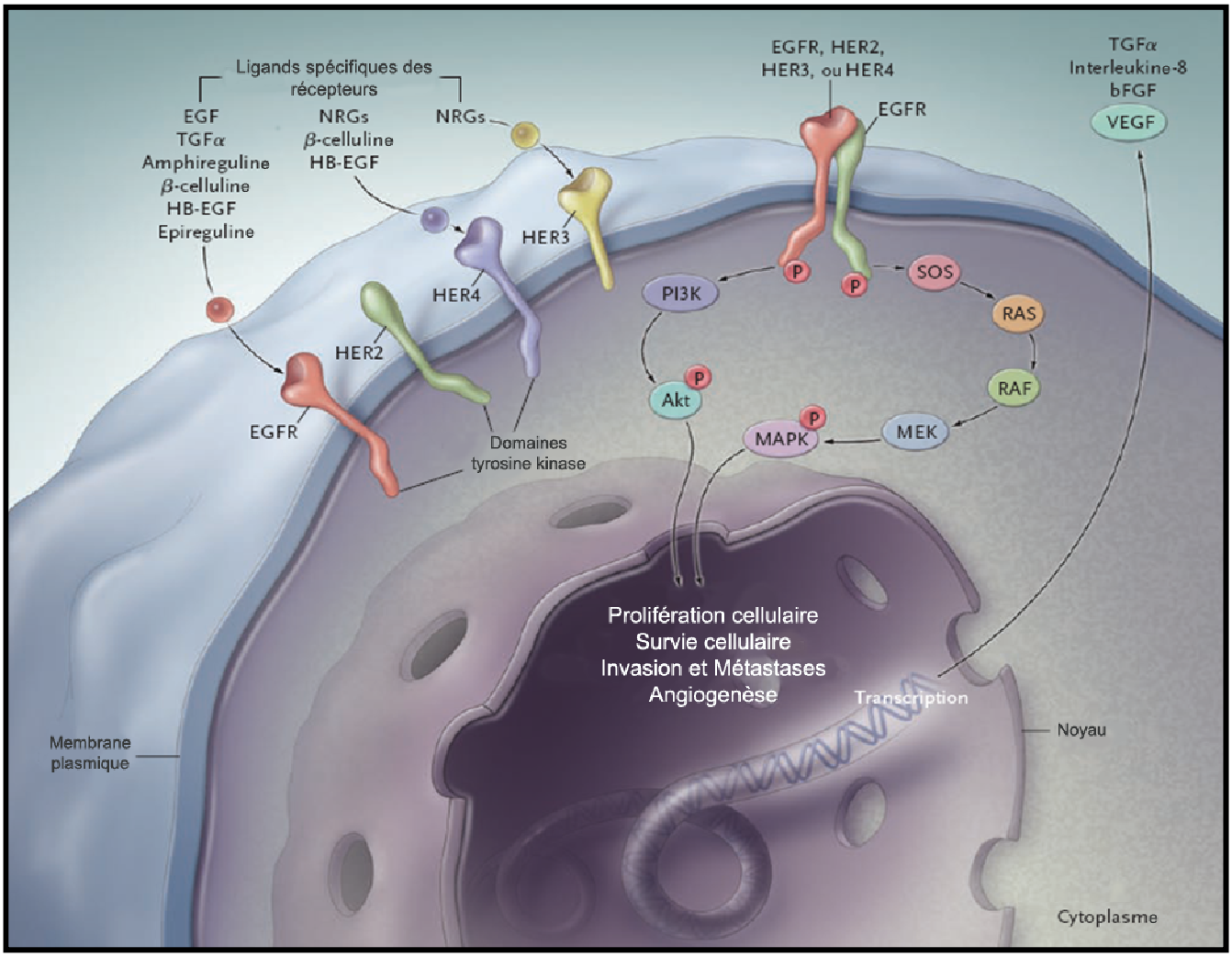


Figure 4. Voies de signalisation contrôlée par l'activation de l'EGFR.
Tout d'abord, la fixation du ligand sur le récepteur va permettre l'association de deux monomères en un dimère actif. Cette dimérisation du récepteur conduit ensuite à l'activation de l'activité tyrosine kinase du domaine intracellulaire, qui se traduit par à une autophosphorylation du récepteur au niveau de son extrêmité C-terminale Ce processus va se poursuivre par l'activation, *via* une phosphorylation en cascade, de diverses voies de signalisation intracellulaire, en particulier la voie RAS/MAPK, la voie phospatidylinositol-3-kinase/Akt (PI3K/Akt) et la voie STAT. L'activation de ces différentes voies initie la transcription d'évènements influençant l'apoptose, l'angiogenèse, la motilité cellulaire, l'invasion, l'adhésion et la réparation.
D'après Ciardiello et coll., 2008.

Une grande variété de signaux cellulaires résulte donc des nombreuses combinaisons entre les 11 ligands et les 10 dimères possibles (tableau IV).
Les dimères les plus actifs sont ceux comprenant HER2 qui, bien que ne possédant pas de ligand, va être activé lors de son association avec un autre membre de la famille HER. HER2 constitue donc un partenaire privilégié pour la formation d'hétérodimères, même si sa surexpression dans certaines tumeurs peut entraîner la formation d'homodimères (Yarden et Sliwkowski, 2001).

La dimérisation du récepteur conduit à l'activation de la tyrosine kinase intracellulaire, et se traduit par une autophosphorylation du récepteur au niveau de son extrémité C-terminale. Cette activation permet ensuite le recrutement de différents effecteurs possédant des motifs de reconnaissance pour ces phosphotyrosines : domaines SH2 (*Src Homology domain 2*) et PTB (*PhosphoTyrosine Binding*). Ce processus va se poursuivre par l'activation, *via* une phosphorylation en cascade, de diverses voies de signalisation intracellulaire. En particulier, les récepteurs HER présentent de fortes interactions avec la voie RAS/MAPK, la voie phospatidylinositol-3-kinase/Akt (PI3K/Akt) et la voie STAT. La voie MAP-kinase (*Mitogen Activated Protein Kinase*) stimule la synthèse de nombreux facteurs de transcription. Cette voie est essentielle dans la prolifération et la différenciation cellulaire. La voie PI3-kinase joue un rôle dans le contrôle des voies anti-apoptotiques par activation de la protéine kinase Akt. Enfin, la voie de STAT3 est impliquée dans la prolifération, l'apoptose et l'angiogenèse.
L'activation de ces voies initie donc la transcription d'évènements influençant l'apoptose, l'angiogenèse, la motilité cellulaire, l'invasion, l'adhésion et la réparation (Figure 4) (Prenzel et coll., 2001). Les récepteurs HER possèdent des sites de phosphorylation sur différentes tyrosines, expliquant la diversité des voies de signalisation activées en fonction des ligands et des partenaires associés dans les dimères (Holbro et Hynes, 2004 ; Yarden et Sliwkowski, 2001).

D'autre part, la détermination de la voie de signalisation engagée, dépend également de la durée d'activation du récepteur. Dans le cas de l'EGFR, l'internalisation et l'adressage vers l'endosome semble être le principal moyen d'interrompre le signal, ce qui n'est pas le cas pour les autres récepteurs de la famille HER. Ces deux phénomènes sont contrôlés par le recrutement d'une ubiquitine ligase, le protéine Cbl, par le récepteur activé, ce qui induit l'ubiquitination du récepteur et sa dégradation. Lorsque EGFR forme un dimère avec HER2, son ubiquitination est réduite et les hétérodimères sont internalisés et dégradés plus lentement, potentialisant les effets prolifératifs. L'intervention de phosphatases doit également intervenir

dans la régulation négative des récepteurs HER, mais ce phénomène est encore peu caractérisé.

3 . Les fonctions de l'EGFR

3.1 . Rôle physiologique de l'EGFR

L'activation des voies de signalisation par l'EGFR, et les récepteurs HER en général, participe à la prolifération, à la migration, à la différenciation et au contrôle du métabolisme de nombreux types cellulaires. Un effet anti-apoptotique leur est également attribué.

Au cours de la vie, l'EGF et son récepteur sont impliqués dans le développement et le maintien des épithéliums, notamment au niveau de la peau, des intestins, du foie, des poumons, des glandes mammaires. Des expériences d'inactivation de gènes chez la souris ont permis de découvrir son implication dans la différenciation et la prolifération cellulaire au cours du développement embryonnaire et son importance pour la physiologie chez l'adulte. Ainsi, des souris *knock-out* (KO) pour le gène de l'*EGFR* présentent un retard du développement embryonnaire et un taux de mortalité élevé. La majorité des nouveaux-nés décèdent avant 8 jours, présentant de nombreux signes de prématurité, de dysfonctionnements cérébraux et des anomalies épithéliales variées au niveau de la peau, des poumons, des reins ou du tractus gastro-intestinal (Sibilia et Wagner, 1995 ; Threadgill et coll., 1995 ; Miettinen et coll., 1995).

3.2 . Implication de l'EGFR dans la carcinogenèse

L'implication de la voie EGFR dans la carcinogenèse a été mise en évidence à partir de modèles de tumeurs induites par des virus (Menzo et coll., 1993 ; Miller et coll., 1995 ; Straight et coll., 1995).

Historiquement, l'EGFR a été un des premiers proto-oncogènes cellulaires humains identifiés (Ushiro et Cohen, 1980), et le premier proto-oncogène membranaire à activité tyrosine kinase directement impliqué dans la carcinogenèse humaine (Gschwind et coll., 2004).

Type tumoral	Pourcentage des tumeurs présentant une surexpression
Gliomes	86 à 92 %
Voies aéro-digestives supérieures	47 %
Sein	37 %
Cancers bronchiques non à petites cellules	40 à 81 %
Estomac	33 à 81 %
Pancréas	30 à 50 %
Colon / Rectum	25 à 100 %
Ovaire	35 à 70 %
Prostate	40 à 89 %

Tableau V. Niveau d'expression des récepteurs HER dans les tumeurs humaines.
Le pourcentage est déterminé par immunohistochimie.

L'hyperactivation de la voie EGFR dans les tumeurs peut être due à différents mécanismes (Gschwind et coll., 2004 ; Holbro et coll., 2003) :

- la surexpression du récepteur lui-même (en partie seulement liée à l'amplification du gène), qui est retrouvée dans un grand nombre de localisations tumorales (cancers de la tête et du cou, du poumon, du colon, du pancréas, du rein, etc.),
- la surexpression des ligands (essentiellement l'EGF et le TGF-α). Ces ligands sont produits par la tumeur elle-même et activent l'EGFR de manière constitutive (Salomon et coll., 1995).
- l'activation intrinsèque du récepteur indépendante du ligand (mutations activatrices de l'EGFR). La mutation activatrice la plus fréquemment observée est une délétion d'une partie du domaine extracellulaire de l'EGFR, appelé type III (EGFRvIII). Elle est commune dans les glioblastomes (Ekstrand et coll., 1992), et est également exprimée dans les carcinomes du rein, du sein et du poumon (Moscatello et coll., 1995)

Les effets de l'activation de la voie de l'EGFR sur les cellules tumorales sont multiples et convergent vers une augmentation de la croissance cellulaire en favorisant la prolifération et en diminuant les mécanismes d'apoptose mais aussi en stimulant l'angiogenèse et les processus d'invasion tumorale.

La surexpression des récepteurs HER est présente dans de nombreux types tumoraux et varient selon les tumeurs. En particulier l'EGFR est surexprimé dans les cancers colorectaux, les cancers ORL ou les cancers broncho-pulmonaires (tableau V).

Enfin, il a été décrit que la progression tumorale était plus agressive chez les patients dont les tumeurs présentent des altérations de la signalisation de l'EGFR. De plus, ces modifications sont généralement associées à un mauvais pronostic (Nicholson et coll., 2001 ; Hynes et Lane, 2005 ; Krause et Van Etten, 2005).

3.2.1 . Rôle de l'EGFR dans la carcinogenèse pulmonaire

L'EGFR est exprimé à la fois dans le poumon sain et dans les carcinomes pulmonaires. Il est exprimé dans tous les types histologiques de carcinomes pulmonaires, et plus particulièrement, il est surexprimé dans 40 à 80 % des CBNPC et dans presque 100 % des cas de carcinomes. Entre 20 et 50 % des CBNPC sont caractérisés par un gain du nombre de copies du gène *EGFR*. La surexpression de l'EGFR est corrélée avec une tumeur faiblement

différenciée, ayant un fort pouvoir de prolifération et un fort pouvoir métastatique. Ainsi les CBNPC surexprimant l'EGFR sont de mauvais pronostic (Salomon et coll., 1995).

De plus, nombre de ces tumeurs sont indépendantes vis-à-vis des facteurs de croissance présents dans l'environnement tumoral, car elles sont capables de secréter les ligands de l'EGFR tels l'EGF, l'amphiréguline ou l'HB-EGF de manière autocrine. Ainsi un signal constitutif de prolifération cellulaire est induit par la stimulation continue et autonome de l'EGFR (Salomon et coll., 1995, Pollard et coll., 2004). Enfin, des mutations activatrices du domaine tyrosine kinase sont décrites (Lynch et coll., 2004 ; Paez et coll., 2004). Elles activent l'EGFR de manière constitutive et permanente.

3.2.2 . Rôle de l'EGFR dans la carcinogenèse colorectale

Le récepteur à l'EGF apparaît comme un élément clé de la carcinogenèse colorectale, à la fois par son fort niveau d'expression et par les phénomènes qu'il régule *via* les voies de signalisation. L'activation oncogénique de l'EGFR dans les tumeurs du colon et du rectum passe par de nombreux mécanismes :

- l'augmentation de l'expression, caractérisée par une augmentation du nombre de récepteurs à la surface des cellules. Ce phénomène peut lui-même résulter d'une amplification génique, d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle ou d'une stabilisation accrue du récepteur. L'EGFR est surexprimé dans 65 à 75 % ces cancers colorectaux (Goldstein et Armin, 2001),
- les mutations entraînant la synthèse d'un récepteur ayant perdu le domaine extracellulaire et rendu constitutionnellement actif (variant activé EGFRvIII) sont assez fréquentes dans les carcinomes colorectaux (Moscatello et coll., 1998). Les mutations du domaine intracellulaire, telles qu'elles ont pu être identifiées dans les cancers broncho-pulmonaires, semblent par contre un évènement rare voire inexistant dans les tumeurs colorectales (Nagahara et coll., 2005 ; Lee et coll., 2005),
- la présence en grande quantité de TGF-α dans les tumeurs colorectales est responsable d'une boucle autocrine d'activation continue de l'EGFR, induisant une activation anti-apoptotique et favorisant la perte de l'ancrage de la cellule à la matrice extracellulaire (Karnes et coll., 1998).

Au vue des différentes implications de l'EGFR dans les carcinogenèses broncho-pulmonaires et colorectales, ce récepteur constitue donc une cible de choix pour le développement de nouvelles thérapeutiques moléculaires ciblant l'EGFR.

Caractéristiques	Anticorps monoclonaux	Inhibiteurs de tyrosine kinase
Voie d'administration	Voie intraveineuse (généralement chaque semaine, ou toutes les deux semaines)	Voie orale (généralement, prise quotidienne)
Structure	Immunoglobulines recombinantes (150-180 kD)	Composés de faible poids moléculaire (400-600 kD)
Sélectivité pour la cible	Exclusivement spécifiques de l'EGFR	Relativement spécifiques de l'EGFR Inhibition de l'EGFR uniquement ou de tous les récepteurs de la famille de l'EGFR Certains TKIs de l'EGFR peuvent également inhiber le VEGF
Mécanismes d'interférence avec l'activation de l'EGFR	Fixation à la partie extracellulaire du récepteur, empêchant la fixation du ligand et la dimérisation du récepteur	Fixation à la partie intracellulaire du récepteur, au niveau du domaine tyrosine kinase ; entre en compétition avec l'ATP et inhibe l'autophosphorylation du récepteur. Fixation réversible ; des inhibiteurs irréversibles sont en cours de développement clinique
Effets cellulaires de l'inhibition de l'EGFR	Inhibe la prolifération cellulaire (arrêt en phase G1), la production de VEGF, l'angiogenèse et l'invasion cellulaire. Potentialise l'activité des drogues cytotoxiques et de la radiothérapie	Inhibe la prolifération cellulaire (arrêt en phase G0-G1), la production de VEGF, l'angiogenèse et l'invasion cellulaire. Potentialise l'activité des drogues cytotoxiques et de la radiothérapie
Induction de l'internalisation, de la régulation et de la dégradation de l'EGFR	Oui	Non (bien que les TKIs de l'EGFR puissent induire la dégradation et la régulation de l'EGFR)
Inhibition de la signalisation intracellulaire dépendante de l'EGFR	Oui	Oui
Activité sur les protéines EGFR mutées	Probablement, pour les mutations du domaine tyrosine kinase, malgré la fixation des anticorps monoclonaux au niveau extracellulaire Pas complètement connu pour les mutations du domaine extracellulaire du récepteur	Oui - pour les mutations du domaine tyrosine kinase (délétion des codons 746-750 de l'exon 19 et mutation L858R de l'exon 21), qui permettent une fixation de haute affinité avec les TKIs (erlotinib et gefitinib) Non - pour les mutations de résistance acquises (T790M de l'exon 20)
Activation de la réponse immunitaire	Oui – la cytotoxicité dépendante des anticorps contribue à l'activité anti-tumorale des anticorps monoclonaux anti-EGFR, comme le cetuximab ; cette cytotoxicité n'a pas été rapportée avec le panitumumab	Non

Tableau VI. Caractéristiques fonctionnelles et pharmacologiques des inhibiteurs de l'EGFR.

Chapitre 2 : Les thérapeutiques ciblant l'EGFR

Actuellement, les thérapeutiques ciblées utilisées en cancérologie font principalement appel à deux grandes catégories de molécules, les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) (Modi et Seidman, 2002). Le ciblage du récepteur au facteur de croissance épidermique représente une des avancées les plus prometteuses sur le plan clinique (Artaega, 2001 ; Baselga, 2001 ; Ciardiella et Tortora, 2008 pour revues) (tableau VI). Parmi les produits ciblant l'EGFR, les agents les mieux connus et les plus avancés du point de vue clinique sont, pour les anticorps monoclonaux : le cetuximab (Erbitux®) et le panitumumab (Vectibix®), et pour les TKIs : le gefitinib (Iressa®) et l'erlotinib (Tarceva®).

1 . Les anticorps monoclonaux

Les premiers anticorps monoclonaux spécifiques de l'EGFR ont été isolés, il a y une vingtaine d'années, à partir de récepteurs partiellement purifiés (Sato et coll., 1983 ; Schreiber et coll., 1981). Les anticorps monoclonaux dirigés contre l'EGFR se lient spécifiquement au domaine extracellulaire et entrent en compétition avec la fixation du ligand. Ceci entraînant un blocage de la dimérisation et de l'autophosphorylation et par conséquent une inhibition des voies de transduction du signal. Ces anticorps reconnaissent exclusivement l'EGFR et possèdent une très grande sélectivité pour ce récepteur.

Les mécanismes d'action, les effets pharmacologiques et les spectres d'activité des anticorps monoclonaux anti-EGFR et des inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR ne sont pas complètement élucidés et présentent certaines de leurs différences peuvent être cliniquement pertinentes (tableau VI). Les anticorps monoclonaux, et plus particulièrement le cetuximab, peuvent susciter une réponse immune anti-tumorale de l'hôte, impliquant une cytotoxicité à médiation cellulaire, dépendante de l'anticorps (Figure 5). En outre, ils peuvent également induire l'internalisation de l'EGFR et réguler sa dégradation (Figure 5). Ces deux mécanismes semblent contribuer de manière importante à l'activité anti-tumorale des anticorps. Enfin, leur pharmacocinétique est beaucoup moins sujette à la forte variété interindividuelle.

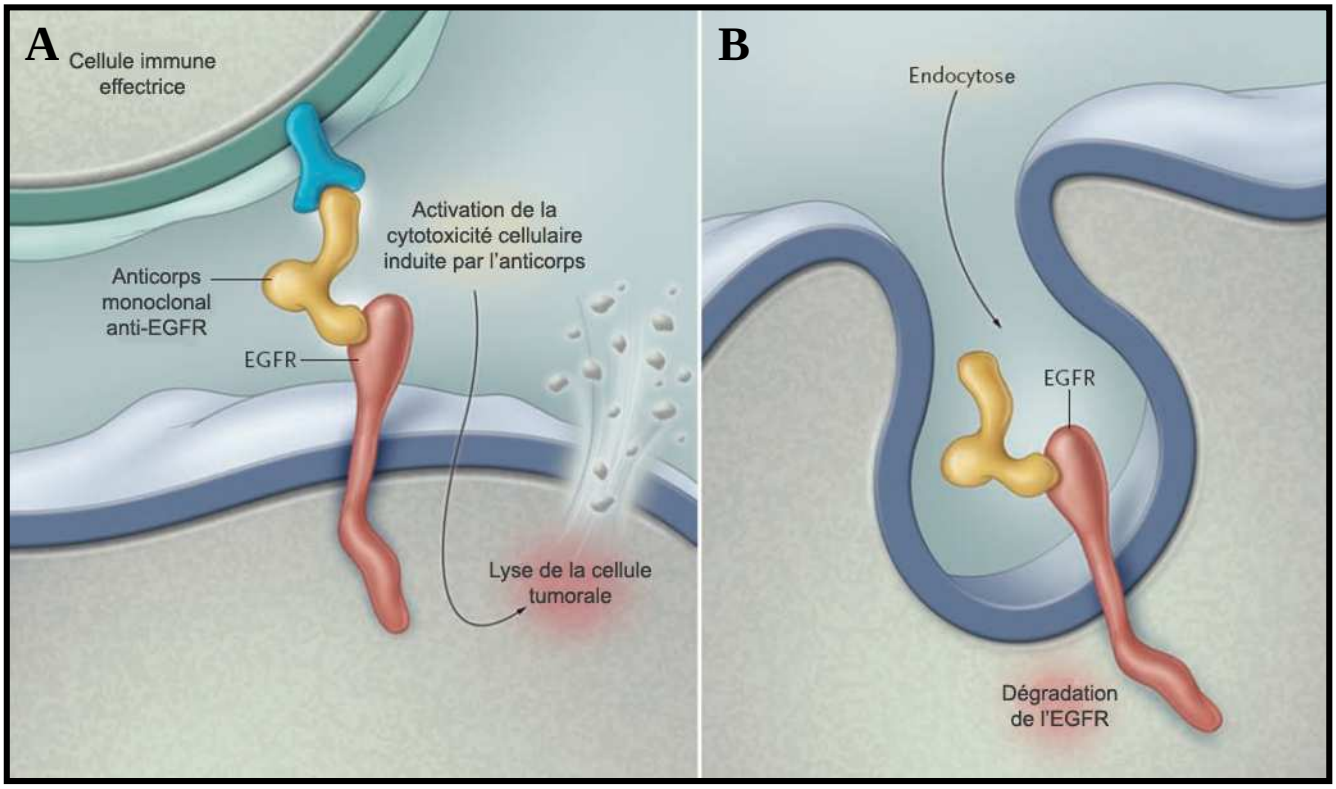


Figure 5. Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux anti-EGFR sur les cellules tumorales.
Le cetuximab (anticorps monoclonal anti-EGFR), qui est une immunoglobuline IgG1, peut susciter la réponse immune anti-tumorale de l'hôte, impliquant une cytotoxicité à médiation cellulaire, dépendante de l'anticorps (partie A). De plus, les anticorps monoclonaux anti-EGFR peuvent induire l'internalisation de l'EGFR et sa diminution, régulant ainsi la dégradation du récepteur (partie B). Ces deux mécanismes semblent contribuer de manière importante à l'activité anti-tumorale des anticorps anti-EGFR.
D'après Ciardiello et coll., 2008.

Anticorps	Caractéristique	Tumeurs candidates	Stade de développement
Cetuximab (Erbitux®)	Chimérique	Colon, VADS, Pancréas, CBNPC	Commercialisé
Panitumumab (Vectibix®)	Humain	Colon	Commercialisé
Matuzumab (EMD-7200)	Humanisé	VADS, Colon, Ovaire, Col de l'utérus	Phase II
h-R3	Humanisé	VADS	Phase II

Tableau VII. Principaux anticorps monoclonaux et leur stade de développement clinique.
CBNPC : Carcinome Bronchique Non à Petites Cellules ; VADS : Voies Aéro-Digestives Supérieures

Actuellement différents anticorps monoclonaux sont utilisés ou en cours de développement (tableau VII). Certains ont déjà montré leur activité clinique sur de nombreuses tumeurs solides, incluant les cancers colorectaux et les CBNPC. Ils sont tous administrés par voie intraveineuse. Seuls le cetuximab et le panitumumab seront présentés.

1.1 . Le cetuximab

Le cetuximab (Erbitux®) est un anticorps monoclonal chimérique (humain/murin) IgG1 se liant spécifiquement au domaine extracellulaire de l'EGFR. Il présent une affinité et une spécificité pour le récepteur de l'EGF supérieures à celles des ligands naturels EGF et TGF-α.

Les nombreuses études précliniques ont permis de préciser le mécanisme d'action des anticorps anti-EGFR. Ainsi, *in vitro*, le cetuximab présente une activité cytostatique sur les lignées cellulaires (Overholser et coll., 2000). Les études sur des modèles de xénogreffe ont mis en évidence une activité supérieure *in vivo* par rapport à l'activité attendue d'après les résultats obtenus *in vitro*. Cette différence d'activité, qui n'est pas observée avec les inhibiteurs de tyrosine kinase, pourrait s'expliquer par des mécanismes hôte-dépendants, notamment par les phénomènes de cytotoxicité anticorps et/ou complément-dépendante (figure 5) (Carter, 2001). Le cetuximab est également capable d'induire l'internalisation de l'EGFR et sa dégradation (Lilenbaum, 2006a). Les modèles précliniques ont également mis en évidence une synergie avec la chimiothérapie et les radiations ionisantes (Ciardello et coll., 1999 ; Prewett et coll., 2002 ; Bonner et coll., 2000).

Initialement, le développement clinique du cetuximab a été focalisé sur la prise en charge des cancers colorectaux métastatiques, en association avec une chimiothérapie. L'étude de phase II, associant le cetuximab à l'irinotécan, a montré un taux de réponse supérieure par rapport à l'irinotécan utilisé en monothérapie chez des patients considérés comme résistant à l'irinotécan (Saltz et coll., 2004). Ces résultats ont été confirmés par une étude randomisée de phase III, comparant la combinaison cetuximab-irinotécan au cetuximab en monothérapie. L'association permet d'obtenir un taux de réponse significativement supérieur (22,9 % *versus* 10,8 %), ainsi qu'une augmentation de la survie médiane sans progression. Cependant, la survie globale n'est pas significativement différente (Cunningham et coll., 2004).

Ces données ont aboutit, en 2004, à l'obtention d'un agrément aux Etats-Unis du cetuximab pour le traitement des patients atteints de cancers colorectaux métastatiques

réfractaires au traitement par irinotécan, en association avec l'irinotécan, ou seul pour le traitement des patients ne tolérant pas l'irinotécan.

Une étude récente de phase III comparait la combinaison cetuximab-irinotécan *versus* irinotécan en seconde ligne de traitement pour le traitement des patients non répondeurs à une chimiothérapie à base d'oxaliplatine. Les résultats montrent que l'association cetuximab-irinotécan est significativement plus efficace que l'irinotécan utilisé en monothérapie, à la fois en terme de taux de réponse, d'augmentation de la survie sans progression et d'amélioration de la qualité de vie (Eng et coll., 2007).

Actuellement, le cetuximab est utilisé en 1ère ligne de chimiothérapie, en association avec d'autres drogues anti-tumorales, telles que l'oxaliplatine ou le 5FU, (Folprecht et coll., 2006 ; Tabernero et coll., 2007 ; Van Cutsem et coll., 2007), pour le traitement des patients atteints de cancers colorectaux métastatiques exprimant l'*EGFR* et exprimant *KRAS* non muté (type sauvage). L'association du cetuximab avec le bevacizumab (anticorps monoclonal anti-VEGF) est également évaluée (Saltz et coll., 2005).

Le cetuximab est également indiqué dans les carcinomes de la tête et du cou localement avancés en association avec la radiothérapie (Bonner et coll., 2006). Cette association prolonge significativement la durée de vie sans progression, la durée du contrôle locorégional de la tumeur et la survie. Des résultats similaires sont obtenus dans les essais évaluant l'association cetuximab-cisplatine ou cetuximab-5FU (Vermorken et coll., 2007).

Enfin, cet anticorps a fait l'objet de nombreuses investigations dans le CBNPC. En 1ère ligne, il existe des résultats de phase II relativement encourageants. Ainsi l'essai de phase II randomisé (Rosell et coll, 2004), comparant en 1ère ligne thérapeutique l'utilisation d'une chimiothérapie par cisplatine et vinorelbine associée ou non au cetuximab, a montré une amélioration du taux de réponse chez les patients traités par cetuximab (31,7 % *versus* 20 %). Les résultats de l'essai de phase III, cisplatine-vinorelbine *versus* cisplatine-vinorelbine plus cetuximab chez des patients atteints de CBNPC avec une surexpression de l'EGFR (étude FLEX) sont actuellement attendus. Deux autres essais d'utilisation du cetuximab dans la prise en charge de 1ère ligne des CBNPC, en association avec une chimiothérapie gemcitabine/sels de platine (étude randomisée de phase II) (Butts et coll., 2007) ou carboplatine/paclitaxel ou docétaxel (essai de phase III) se sont avérés négatifs (Lynch et coll., 2007).

Les essais évaluant l'utilisation du cetuximab en seconde ligne de traitement, seul ou en association avec une chimiothérapie, sont également décevants (Hanna et coll., 2006).

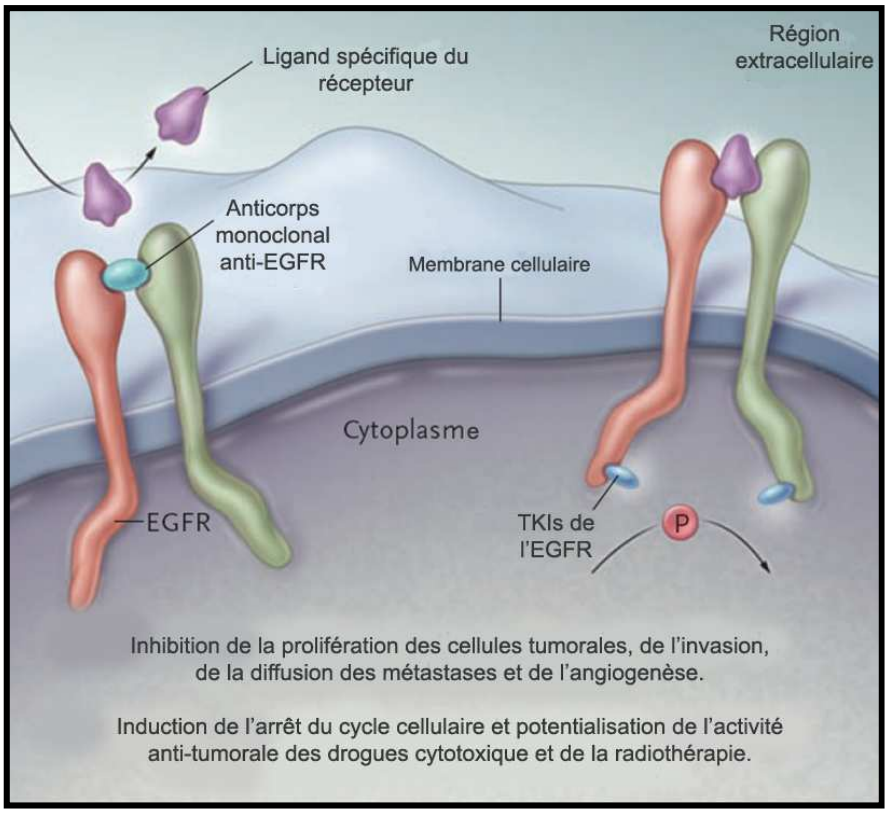


Figure 6. Mécanismes d'action des molécules anti-EGFR sur les cellules tumorales.

Les anticorps monoclonaux se lient domaine extracellulaire de l'EGFR et bloquent la liaison du ligand et l'activation du récepteur. Les petites molécules, inhibitrices de tyrosine kinase(TKIs) de l'EGFR, entrent en compétition avec l'ATP pour la liaison au niveau du domaine tyrosine kinase intracellulaire, et bloquent l'autophosphorylation et de la signalisation située en aval.

D'après Ciardiello et coll., 2008.

Cependant, l'association du cetuximab avec la radiothérapie semble prometteuse dans les stades localement avancés.

1.2 . Le panitumumab

Le panitumumab (Vectibix®) est un anticorps complètement humanisé IgG2 de haute affinité pour l'EGFR. Il est actuellement indiqué en monothérapie pour le traitement des patients atteints de cancers colorectaux métastatiques exprimant l'EGFR et exprimant KRAS non muté (type sauvage), après échec des protocoles de chimiothérapies à base d'oxaliplatine et d'irinotécan (Wu et coll., 2008).

Il existe actuellement peu de données sur l'efficacité de cette molécule dans le traitement des CBNPC. Les résultats d'une étude de phase II randomisée comparant l'association taxol-carboplatine associé ou non au panitumumab en 1ère ligne thérapeutique sont attendus avec intérêt (Crawford et coll., 2004).

1.3 . Tolérance aux anticorps monoclonaux anti-EGFR

Les anticorps monoclonaux anti-EGFR présentent un profil de tolérance tout à fait acceptable. Les toxicités sont essentiellement cutanées (80 %) (rash cutané, stomatite) et digestives (diarrhées, nausées, vomissements). Plus rarement, des réactions anaphylactiques peuvent apparaître chez 5 % des patients lors de la première administration. Une prémédication par un antihistaminique est donc recommandée. Une réaction majeure peut entraîner la diminution de doses, voire un arrêt du traitement, bien qu'elle soit généralement corrélée à une efficacité thérapeutique sur le cancer lui-même.

2 . Les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKIs)

La cible principale des inhibiteurs de tyrosine kinase (TKIs) est le site de fixation de l'ATP, partenaire clé dans la phosphorylation et donc dans l'activation du récepteur à activité tyrosine kinase. Les TKIs empêchent la fixation de l'ATP sur la tyrosine kinase, en entrant en compétition pour son site de fixation, inhibant alors l'activité de phosphorylation (figure 6) (Ciardella et coll., 2001 ; Noonberg et Benz, 2000). En pratique, la spécificité des TKIs de l'EGFR n'est pas absolue, car près d'une centaine de tyrosine-kinases intracellulaires peuvent

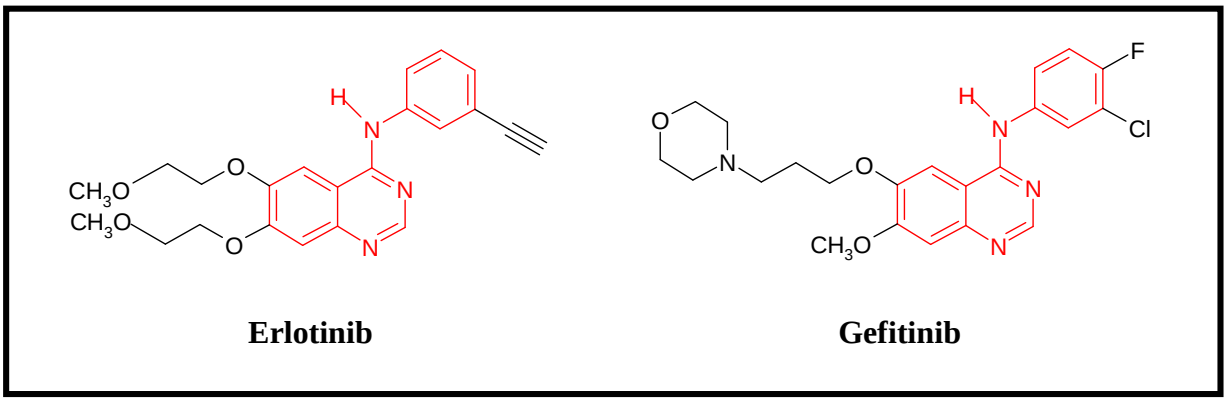


Figure 7. Structures chimiques des inhibiteurs de tyrosines kinase de l'EGFR.
Le noyau quinazoline est représenté en rouge

être ciblées par leur poche ATP (Krause et Van Etten, 2005). Pour certaines molécules, cette réactivité croisée peut être considérée comme une voie d'action supplémentaire, notamment en inhibant les autres récepteurs de la famille HER (inhibiteurs dit pan-HER ou mutli-HER). D'autre part, l'action des TKIs n'est pas complètement établie : l'action des TKIs est-elle limitée à l'inhibition de l'activité enzymatique ou y a-t-il interaction avec les processus d'internalisation et de dégradation du récepteur ?

Parmi tous les pharmacophores identifiés lors du développement des TKIs de l'EGFR la classe des anilinoquinazolines est aujourd'hui la mieux représentée au niveau des activités observées dans différents essais cliniques. En effet, *in vitro* le noyau quinazoline est capable d'inhiber l'activité tyrosine kinase de l'EGFR de manière importante et ainsi d'inhiber la prolifération cellulaire induite par l'EGFR (Ward et coll., 2004). L'étude des relations structure-activité du noyau quinazoline et sa substitution par différents groupements, améliorant les propriétés physico-chimiques et réduisant l'instabilité métabolique, ont conduit au développement de deux molécules, le gefitinib et l'erlotinib (figure 7), actuellement utilisées en clinique (administration par voie orale). *In vitro* et *in vivo*, ces composés inhibent l'autophosphorylation et la cascade de signaux intracellulaires, de manière dose dépendante. Les études précliniques ont mis en évidence leur action cytotoxique en monothérapie sur de nombreuses lignées tumorales humaines ainsi que leur synergie d'action avec les agents de chimiothérapie conventionnels (notamment les sels de platine, les anthracyclines et les taxanes) et les radiations ionisantes.

2.1 . Le gefitinib

Le gefitinib (ZD1839, Iressa®) a été le premier TKI réversible de l'EGFR a avoir été évalué en essai clinique. Deux essais de phase II ont montré une activité clinique anti-tumorale importante du gefitinib chez des patients atteints de CBNPC, ne répondant pas à une ou plusieurs lignes de chimiothérapies (à base de sels de platine et de docétaxel). Il s'agit des études IDEAL 1 (gefitinib utilisé en 2ème et 3ème ligne de chimiothérapie) (Fukuoka et coll., 2003) et IDEAL 2 (gefinitib en 3ème ligne de chimiothérapie) (Kris et coll., 2003). Dans ces essais, le gefitinib présente une amélioration de réponse objective et de la survie médiane, ainsi qu'un meilleur profil de toxicité comparé aux chimiothérapies. En 2003, ces données ont permis l'obtention d'un agrément aux Etats-Unis pour l'utilisation du gefitinib dans le

traitement de 3ème ligne des patients atteints de CBNPC de stade avancé en progression après échec de la chimiothérapie (sels de platine et docétaxel).
Cependant, l'étude randomisée de phase III ISEL (Iressa Survival Evaluation in Lung cancer) qui comparait, chez des patients atteints de CBNPC de stade avancé, le gefinitib en 2ème ou 3ème ligne de traitement à des soins de support a échoué dans la démonstration que le gefitinib améliorait la survie des patients (Thatcher et coll., 2005). Aucune différence, de survie médiane ou d'amélioration du taux de survie à un an, est observée chez les patients traités par gefitinib *versus* placebo. Cependant, les analyses planifiées en sous-groupes ont montré que le traitement par gefitinib est associé à une amélioration de la survie chez les femmes, les individus non fumeurs, les patients porteurs d'adénocarcinomes et les patients asiatiques. Deux autres études de phase III ont également démontré que l'association du gefitinib à une chimiothérapie en première ligne de traitement des CBNPC n'apportait pas de bénéfice sur la survie. Le traitement combiné est en outre associé à une toxicité accrue des TKIs (Herbst et coll., 2004 ; Giaccone et coll., 2004). Aux Etats-Unis et en Europe, les indications sont donc réduites aux patients participant à des essais cliniques ou répondeurs en cours de traitement. Malgré ces résultats décevants, le gefitinib est toujours en cours d'évaluation dans différents types de stratégies. En France, il est en cours d'évaluation dans deux essais de phase II. Le premier essai évalue l'intérêt de l'association du gefitinib à la radiothérapie post-opératoire et au cisplatine dans les carcinomes des voies aéro-digestives supérieures. Le second compare trois chimiothérapies, par gefitinib ou par gemcitabine ou par docétaxel, chez des patients fragilisés ayant un CBNPC de stade IV ou IIIB non accessible à un traitement par radiothérapie. A ce jour, les inclusions des patients sont terminées et les résultats sont à paraître. Au niveau mondial, une vingtaine d'essais cliniques (d'après clinicaltrials.gov, 2008) évaluent le gefitinib pour le traitement des CBNPC. Il faudra toutefois attendre quelques années pour préciser la place du gefitinib pour le traitement de ces cancers. Cependant, le gefitinib est toujours commercialisé en Asie, suite à son agrément obtenu au Japon en 2002, car son efficacité a été montrée pour certains sous-groupes de patients, et plus particulièrement les patients d'origine asiatique.

Dans le traitement des cancers colorectaux, l'évaluation de l'utilisation du gefitinib est beaucoup moins avancée. Les études précliniques précoces en monothérapie n'ont pas mis en évidence d'activité anti-tumorale du gefitinib sur les tumeurs colorectales (Mackenzie et coll., 2005). Actuellement, des travaux sont en cours pour définir la place du gefitinib en association à la chimiothérapie (Fisher et coll., 2004).

A ce jour, l'utilisation du gefitinib est évaluée dans de nombreuses pathologies tumorales dans lesquelles l'EGFR joue son rôle d'oncogène. Ainsi, plus de 200 essais cliniques basés sur l'administration du gefitinib, toutes pathologies et stades tumoraux confondus sont recensés sur le site http://clinicaltrials.gov (mars 2009).

2.2 . L'erlotinib

L'erlotinib (OSI-774, Tarceva®) est le second TKI réversible de l'EGFR à avoir été développé suite aux résultats obtenus avec de gefitinib. Après un essai de phase II en 2ème ou 3ème ligne de traitement des CBNPC avancé ou métastatique ayant montré un taux de réponse similaire à celui observé avec le gefitinib (Perez-Soler et coll., 2004), l'erlotinib a fait l'objet d'un essai randomisé de phase III (BR21). Cette étude a évalué l'erlotinib en monothérapie *versus* placebo, en 2ème ou 3ème ligne de traitement des CBNPC, après échec de la chimiothérapie conventionnelle (Shepherd et coll., 2005). La survie médiane et la survie à un an étaient significativement plus importantes dans le bras erlotinib (6,7 mois et 31 %) par rapport au bras placebo (4,7 mois et 21 %), conduisant à une réduction significative de la probabilité de décès. Ces données ont conduit à l'enregistrement aux Etats-Unis (2004) et en Europe (2005) de l'erlotinib pour le traitement en 2ème ou 3ème ligne des CBNPC chimiorésistants. Comme le gefitinib, l'erlotinib a été évalué en première ligne. Les résultats obtenus sont comparables à ceux observés avec une chimiothérapie à base de sels de platine (survie médiane de 10,5 à 13 mois et taux de réponse de 12 à 23 %). Cependant le profil de toxicité est beaucoup plus favorable à l'erlotinib (Giaccone et coll., 2006 ; Akerly et coll., 2006). Enfin, une étude récemment présentée par Lilenbaum et coll. (2006b), comparant l'erlotinib à l'association carboplatine-paclitaxel, n'a pas montré de supériorité de l'erlotinib par rapport à la chimiothérapie. Ce qui confirme qu'en première ligne, un doublet à base de sels de platine est supérieur à l'erlotinib, tout au moins dans le cadre d'une population non sélectionnée. En revanche, des résultats bien meilleurs que ceux observés avec les associations classiques de cytotoxiques, ont été rapportés dans le cadre d'études incluant des patients sélectionnés sur la base de facteurs moléculaires prédictifs de la réponse aux inhibiteurs du gène *EGFR*.

1.3 . Tolérance aux TKIs

La tolérance des TKIs de l'EGFR est relativement bonne (Shah et coll., 2005). Il n'existe pas de toxicité limitante et le profil de toxicité est très différent de celui des chimiothérapies. Les toxicités sont essentiellement cutanées (rash : 45 à 75 %, stomatite : 17 % ; oculaire : 27 %), digestives (diarrhées : 45 à 54 % ; nausées : 15 à 33 % ; vomissements : 10 à 23 % ; anorexie : 7 à 52 %) ; les taux les plus bas étant observés chez les malades recevant le gefitinib. Des pneumopathies toxiques au gefitinib ont été observées avec une incidence de 0,35 % des malades hors Japon et un risque de décès de 0,06 %. Des leucémies ont été observées avec une incidence de 0,8 pour 100 000, sans pour le moment d'imputabilité démontrée. Un risque de mauvaise absorption digestive peut survenir avec des médicaments modifiant le pH gastrique.

Quatrième partie : Facteurs moléculaires prédictifs de la réponse ou de la résistance aux thérapies ciblées de l'EGFR

Chapitre 1 : Les mutations de l'*EGFR*

Une association entre mutations somatiques du gène *EGFR* et la réponse aux TKIs a été mise en évidence dans les CBNPC (Paez et coll., 2004 ; Pao et coll., 2004 ; Lynch et coll., 2004). Ces mutations ont été identifiées au niveau des exons 18 à 21 du gène *EGFR* qui codent pour le domaine à activité tyrosine kinase du récepteur. Elles sont retrouvées dans environ 20 % des tumeurs broncho-pulmonaires, et plus particulièrement dans 10 % des CBNPC.

Des études ont essayé de déterminer la fréquence des mutations de l'*EGFR* sur de larges populations de CBNPC non traités par TKIs. Dans une étude italienne 39 mutations ont été retrouvées sur une série consécutive de 860 CBNPC, représentant une fréquence de 4,5 % (Marchetti et coll., 2005). Dans une compilation de 4 études réalisées aux Etats-Unis et en Asie, 149 mutations ont été retrouvées à partir de 759 prélèvements tumoraux, représentant une fréquence de 19,6 % (Pao et coll., 2005). Ces études ont permis ensuite de préciser les facteurs prédictifs de la présence de mutations de l'*EGFR* que sont l'origine asiatique, le sexe féminin, le type histologique adénocarcinome, et le sous-type histologique carcinome bronchio-alvéolaire, l'absence de tabagisme (Shigematsu et coll., 2005) ; le poids respectif et l'indépendance de ces facteurs variant de manière importante d'une étude à l'autre. L'âge et le stade TNM ne semblent pas influencer ces résultats. Ainsi, dans l'étude italienne, la fréquence des mutations de l'*EGFR* était de 26 % pour les carcinomes bronchio-alvéolaires, 6 % dans les adénocarcinomes non bronchio-alvéolaires et de 0 % dans les épidermoïdes et les CBNPC indifférenciés (Marchetti et coll., 2005).

Quatre-vingt-dix pour cent de ces mutations concernent deux « hot spots ». Dans 45 à 50 % des cas, l'exon 19 comporte une délétion de plusieurs nucléotides éliminant 4 acides aminés hautement conservés (LREA), et dans 35 à 45 % de cas, il s'agit d'une mutation ponctuelle dans l'exon 21, résultant de la substitution d'une leucine par une arginine en

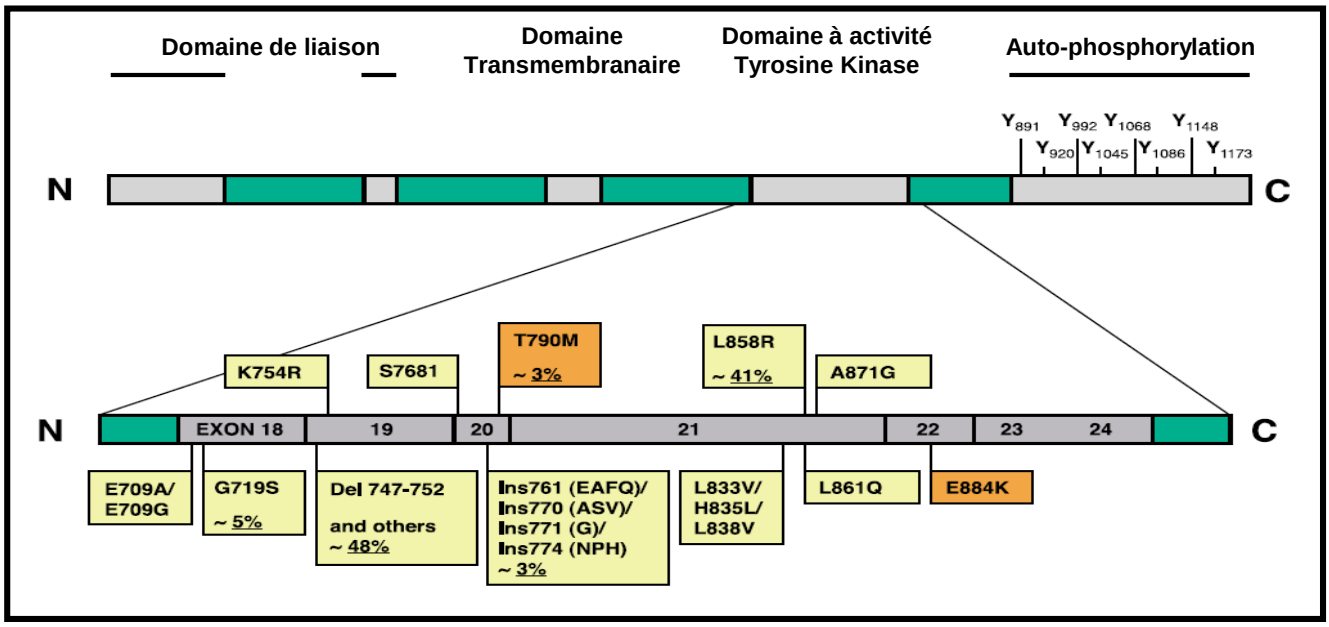


Figure 8. Mutations du domaine kinase du récepteur à l'EGF dans les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC).
Les altérations du domaine kinase, cliniquement pertinentes, et leurs fréquences sont représentées par les fenêtres jaunes. Les mutations qui confèrent la résistance au gefitinib (T790M) ou à l'erlotinib (T790M et E884K) sont également indiquées (fenêtres oranges).
D'après Irmer et coll., 2007.

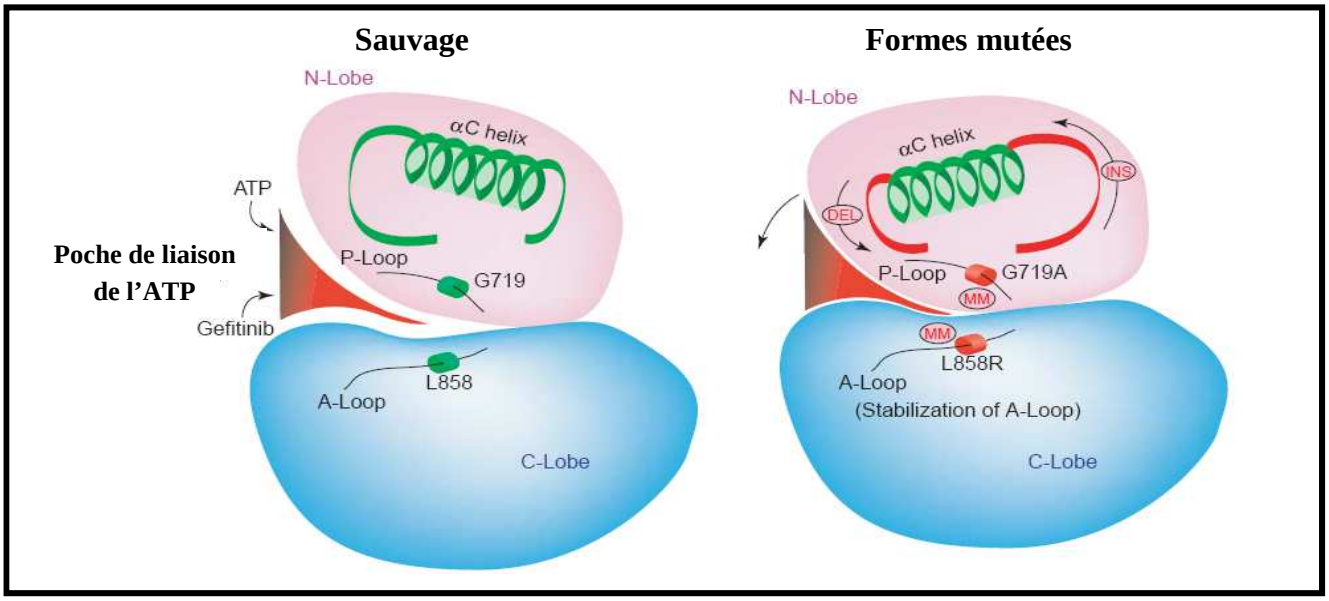


Figure 9. Effets des mutations du domaine Tyrosine Kinase sur la poche de liaison de l'ATP
Les délétions de l'exon 19 (DEL) raccourcissent la boucle dans la région N-terminale de l'hélice. Les insertions et/ou les duplications de l'exon 20 ajoutent un à trois acides aminés au niveau de la boucle C-terminale de l'hélice αC (INS). Les mutations des exons 19 et 20 semblent réorienter le rôle crucial de l'hélice αC de la même manière. Le troisième type de mutation caractérisé se situe dans la boucle d'activation (exon 21), dans laquelle le remplacement des résidus hydrophobes leucine en 858 (commune), et en 861 (rare) par une acide aminé basique ou neutre est en faveur de la stabilisation de la boucle d'activation dans la position active (MM). De rares mutations de l'exon 18 interviennent dans la boucle P (G719S). *D'après Gazdar et coll., 2004.*

position 858 (L858R). Les autres mutations peuvent toucher également les exons 18 (substitution G719M dans 5 % des cas) et 20 (Pao et coll., 2005 ; Irmer et coll., 2007) (Figure 8). Ces mutations se situent au niveau de la poche de fixation de l'ATP du domaine à activité tyrosine kinase et stabilisent les interactions de l'ATP dans son site de liaison. Le récepteur est alors activé de manière constitutive (figure 9). Ces modifications structurales stabilisent également les interactions EGFR-TKIs, rendant le récepteur plus sensible à ces inhibiteurs.

Ces mutations de l'*EGFR* ont initialement été décrites chez des patients ayant présenté une réponse majeure à un TKI de l'EGFR (gefitinib ou erlotinib). Il a également été montré que cette efficacité *in vivo* était associée à une augmentation d'un log de l'efficacité anti-tumorale des TKIs *in vitro* (Paez et coll., 2004). L'étude rétrospective de Han et coll. (2005) portant sur 90 patients a confirmé que la présence de telles mutations était associée à une probabilité plus importante de réponse aux TKIs (77 %), néanmoins les tumeurs de certains malades ayant répondu ne présentaient pas de mutations de l'*EGFR* (10 %). Ces mutations ne sont pas mises en évidence dans le tissu sain péri-tumoral, ne sont pas induites par le traitement par TKIs, ne sont pas retrouvées chez tous les patients répondeurs et n'ont pas été retrouvées chez les malades progresseurs ou stabilisés sous TKIs. Leur présence semble constituer un marqueur de meilleur pronostic, y compris chez les malades ne recevant pas de TKIs de l'EGFR (Pao et Miller, 2005). De plus, la délétion de l'exon 19 est un facteur prédictif de meilleure survie sans progression et de meilleure survie globale (Hirsch et coll., 2003 ; Takano et coll., 2005).
Cependant, dans le cas où les anti-EGFR (gefitinib) sont associés à la chimiothérapie, les mutations du gène *EGFR* semblent perdre de leur puissance prédictive (Bell et coll., 2005).

D'autre part, il a été montré récemment que l'échappement au traitement des patients atteints de CBNPC, initialement répondeur au gefitinib ou à l'erlotinib, était associé au développement de mutations additionnelles au niveau du domaine tyrosine kinase de l'EGFR (Sharma et coll., 2007). La mutation la plus étudiée est la substitution T790M dans l'exon 20. *In vitro*, sa présence est associée à un phénotype de résistance au gefitinib (Pao et coll., 2005) et à l'erlotinib (Kosaka et coll., 2006). Cette mutation se situe également au niveau du domaine tyrosine kinase et entraîne une modification de la structure tridimensionnelle, qui altère la liaison du TKI.

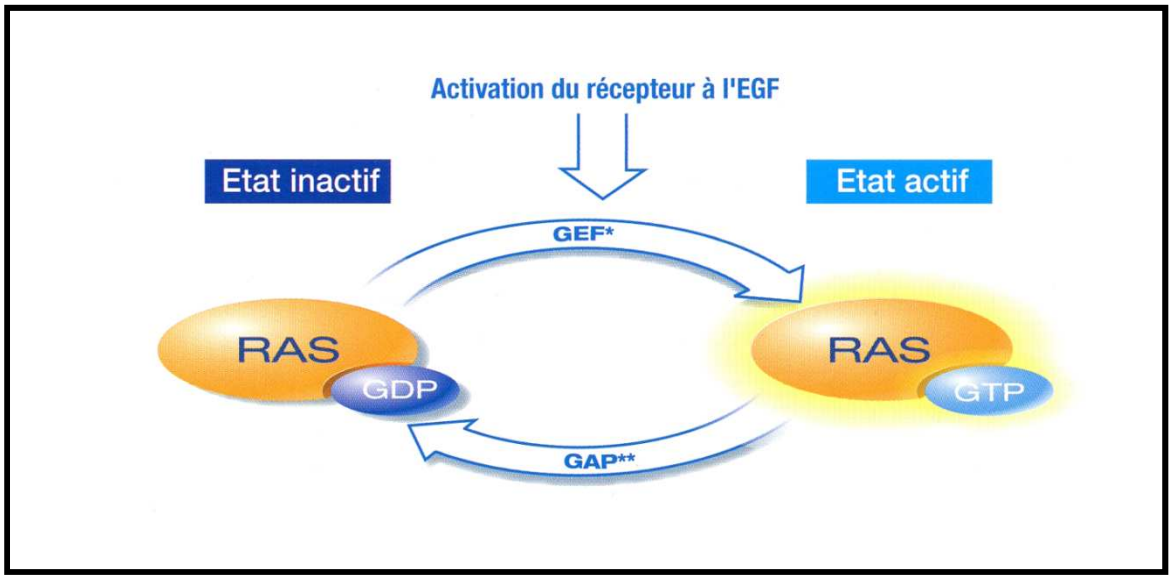


Figure 10. Activation de RAS

A l'état physiologique, les protéines RAS oscillent entre une forme inactive et une forme active, et jouent ainsi un rôle d' « interrupteur moléculaire » au sein des voies de signalisation.

GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor ; GAP : GTPase Activating Protein.

D'après Friday et coll., 2005.

Chapitre 2 : Les mutations de *KRAS*

La famille des protéines RAS est composée de plusieurs membres, dont les protéines KRAS, NRAS et HRAS, présentant une homologie de séquence d'environ 85 %. Ce sont de petites protéines G monomériques dont l'activation est déclenchée par des récepteurs membranaires et notamment par le récepteur à l'EGF. Au sein des cascades de signalisation, les protéines RAS possèdent un rôle « d'interrupteur moléculaire » et oscillent entre deux états (figure 10) (Friday et Adjei, 2005) :

- un état inactif, de repos, pendant lequel RAS est liée au GDP (Guanosine Di-Phosphate) ;
- un état actif, transitoire, pendant lequel RAS est lié au GTP (Guanosine Tri-Phosphate). Cette forme activée permet l'interaction de RAS avec d'autres molécules effectrices et l'activation de différentes voies de signalisation. Cette forme est ensuite « mise sous silence » (forme inactive) par hydrolyse du GTP en GDP par des protéines de régulation telles que les GAP (GTPase Activating Proteins), ainsi que par l'activité GTPase intrinsèque des protéines RAS.

Plusieurs mutations du gène *KRAS* ont été identifiées et sont retrouvées dans 15 à 30 % des CBNPC, 30 à 40 % des cancers colorectaux et dans moins de 5 % des cancers des VADS (Voies Aéro-Supérieures Digestives). Il s'agit de mutations ponctuelles, fréquemment (90%) localisées au niveau des codons 12 et 13 de l'exon 1. Ces mutations ponctuelles affectent le domaine de liaison du GTP, ce qui conduit à la production de protéines KRAS constitutivement actives, indépendamment de ce qui se produit au niveau du récepteur de l'EGF, notamment son blocage par des anticorps anti-EGFR.

Différentes études cliniques ont montré que la présence de mutations du gène *KRAS* est associée à une non-réponse aux TKIs des patients porteurs d'un CBNPC (Pao et coll., 2005 ; Han et coll., 2006 ; Tsao et coll., 2006 ; Eberhard et coll., 2005) et aux anticorps monoclonaux (cetuximab et panitumumab) pour le traitement des cancers colorectaux (Lièvre et coll., 2006 ; De Roock et coll., 2007). Ces dernières analyses ont conduit à une modification de l'AMM du cetuximab et du panitumumab, avec obligation de rechercher le statut mutationnel de *KRAS*, et que celui-ci soit « sauvage » pour prescrire cette chimiothérapie chez les patients porteurs d'un cancer colorectal métastatique.

Technique	Sensibilité (% ADN muté)	Mutations identifiées	Références
Séquençage direct	20 - 25	Connues ou non	Lynch et coll., 2004 Paez, et coll., 2004 Pao et coll., 2004 Sequist et coll., 2007 Goncalves et coll., 2008
PCR-SSCP	10	Connues	Soung et coll., 2005 Sonobe et coll., 2005 Marchetti et coll., 2005
PCR en tems réel (TaqMan®)	10	Connues	Itabashi et coll., 2003 Hilbe et coll., 2003 Endo et coll., 2005
Pyroséquençage	5 à 10	Connues ou non	Ogino et coll., 2005 Poehlmann et coll., 2007
SNaPshot	5 à 10	Connues	Di Fiore et coll., 2007
Courbe de fusion haute résolution (HMR)	5 - 6	Connues ou non	Krypuy et coll., 2006 Do et coll., 2008
PCR-RFLP	5	Connues	Pan et coll., 2005
Génotypage basé sur une analyse en MALDI-TOF MS	5	Connues	Thomas et coll., 2007
Scorpions ARMS	1	Connues	Clayton et coll., 2000 Kimura et coll., 2006 Morinaga et coll., 2008 Zhang et coll., 2008
dHPLC	1	Connues ou non	Jänne et coll., 2006 Cohen et coll., 2006 Chin et coll., 2007 Sueoka et coll., 2007
PCR d ’enrichissement en mutations	0,2	Connues	Asano et coll., 2006

Tableau VIII . Méthodes de détection des mutations du gène *EGFR* et/ou du gène *KRAS*. SSCP : Single-Strand Conformation Polymorphism ; HMR : High Melting Resolution ; MALDI-TOF MS : MAtrix Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry ; ARMS : Amplified Refractory Mutation System ; dHPLC : denaturating High Performance Liquid Chromatography.

Chapitre 3 : Méthodes de détection des mutations de l'*EGFR* et de *KRAS*

La recherche des mutations des gènes *EGFR* et *KRAS* est actuellement utilisée pour le recrutement ciblé de patients pour des essais cliniques et/ou pour guider les décisions thérapeutiques. Toutefois, pour que cette recherche devienne une norme de soins, la détermination des mutations doit être plus fiable, rapide et précise.

Le séquençage direct, utilisé pour de nombreuses études (Lynch et coll., 2004 ; Paez, et coll., 2004 ; Pao et coll., 2004 ; Sequist et coll., 2007 ; Goncalves et coll., 2008), est la méthode de référence actuelle. Cependant, cette technique possède plusieurs inconvénients pour une utilisation clinique. En effet, il s'agit d'une méthode multi-étapes (extraction de l'ADN, amplification par PCR de l'ADN d'intérêt, séquençage et interprétation des séquences), consommatrice de temps et qui augmente le délai d'obtention du résultat. De plus, sa sensibilité n'est pas optimale pour les échantillons cliniques de tumeurs. En effet, le prélèvement doit contenir au moins 25 % d'ADN muté pour que cette mutation soit facilement détectée (Pao et Ladanyi, 2007 ; Eberhard et coll., 2008). Or dans le cas des cancers broncho-pulmonaires et colorectaux, les prélèvements contiennent souvent un fort pourcentage de cellules non néoplasiques, ce qui peut alors fréquemment donner des résultats « faux-négatifs ».

Au cours des cinq dernières années, ces considérations ont donc conduit au développement et à l'évaluation de nombreuses techniques alternatives de détection des mutations des gènes *EGFR* et *KRAS* (tableau VIII).

Les principes des techniques de recherche de mutations les plus utilisées sont décrits ci-après.

1 . La méthode de référence : le séquençage direct

Initialement, deux méthodes ont été développées pour déterminer la succession des nucléotides qui constituent l'ADN : la méthode chimique de A.M. Maxam et W. Gilbert, décrite en 1977, et la méthode enzymatique proposée par F. Sanger en 1981. La méthode utilisée aujourd'hui est une méthode enzymatique automatisée, qui repose sur l'utilisation de nucléotides particuliers appelés didéoxynucléotides (ddNTP), qui bloquent la synthèse

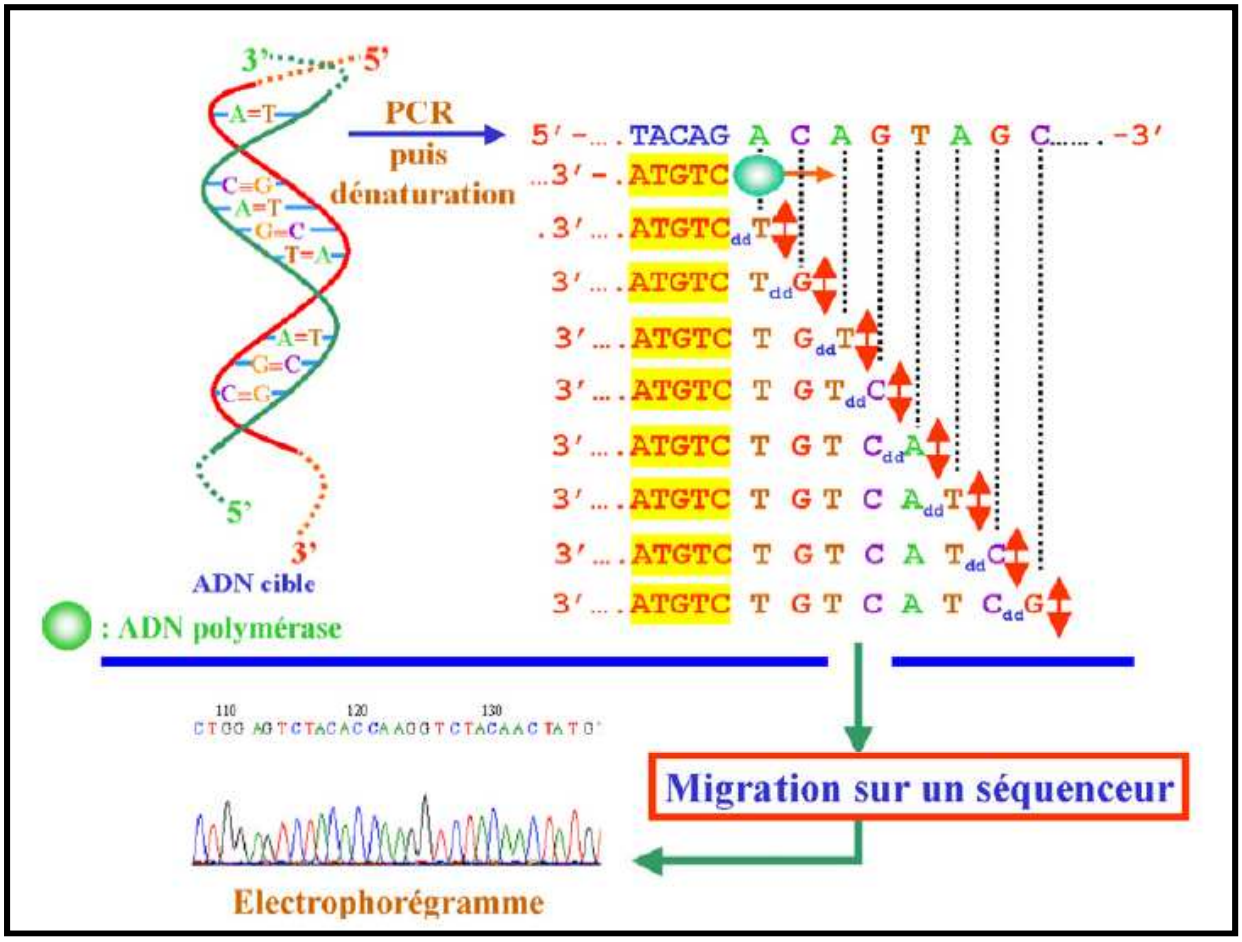


Figure 11. Principe du séquençage selon la méthode de Sanger.
La réaction de séquence permet l'incorporation aléatoire de ddNTP à la place de dNTP, conduisant à la synthèse de fragments de taille différente. Chaque ddNTP étant marqué par un fluorophore différent, l'analyse du signal lumineux généré permet d'obtenir la séquence de l'ADN d'intérêt. Les résultats sont présentés sous forme d'un électrophorégramme.
D'après Lamoril et coll., 2008.

d'ADN par l'ADN polymérase après leur incorporation. Ce blocage est dû à l'impossibilité qu'ont ces nucléotides de former une liaison phosphodiester avec un autre nucléotide en raison de l'absence de groupement hydroxyle sur le carbone 3. Les quatre didéoxynucléotides utilisés sont marqués spécifiquement par des fluorophores différents (vert pour le ddATP, bleu pour le ddCTP, jaune pour le ddGTP et rouge pour le ddTTP). Ils sont incorporés lors de la réaction de séquence, réalisée à partir d'un produit PCR purifié. Le produit PCR purifié utilisé pour la réaction de séquence peut provenir d'une PCR simple (dite PCR classique) ou d'une PCR nichée (*nested PCR*). Statistiquement, au cours de la réaction, pour chaque « base » de l'ADN cible, au moins une fois, un ddNTP complémentaire sera incorporé à la place d'un dNTP. Ainsi, les fragments de différentes tailles obtenus sont analysés par électrophorèse capillaire réalisée sur un automate de séquençage. À la fin de la migration, chaque fragment (contenant un ddNTP marqué par un fluorophore) est excité par un laser. Le signal lumineux généré, dépendant de la base didéoxy incorporée, est analysé par un logiciel spécifique et la séquence est présentée sous forme d'un électrophorégramme (figure 11) (Lamoril et coll., 2008).

Pour confirmer un résultat, toute réaction de séquence d'un fragment d'ADN est systématiquement faite sur le brin sens et anti-sens. Le séquençage permet l'étude de séquences de 100 à 850 pb.

Cette technique de référence apparaît cependant être coûteuse, relativement longue en terme de délai de rendu de résultat et peu sensible lorsque la quantité d'ADN muté présente dans l'échantillon est faible.

2 . Génotypage par méthode SNaPshot

La technique SNaPshot est basée sur l'extension d'une amorce non marquée par une seule base de type dideoxy marquée. Le produit PCR purifié est mis en présence d'une amorce qui vient s'hybrider juste avant la base à incorporer. Cette méthode peut être utilisée pour la recherche de différentes mutations à partir d'un seul produit PCR. Dans ce cas les sondes sont conçues pour avoir des tailles différentes après incorporation du ddNTP marqué. Les fragments sont ensuite analysés par un séquenceur. Cette technique sensible et spécifique a été décrite pour la recherche des mutations de *KRAS* (Di Fiore et coll., 2007).

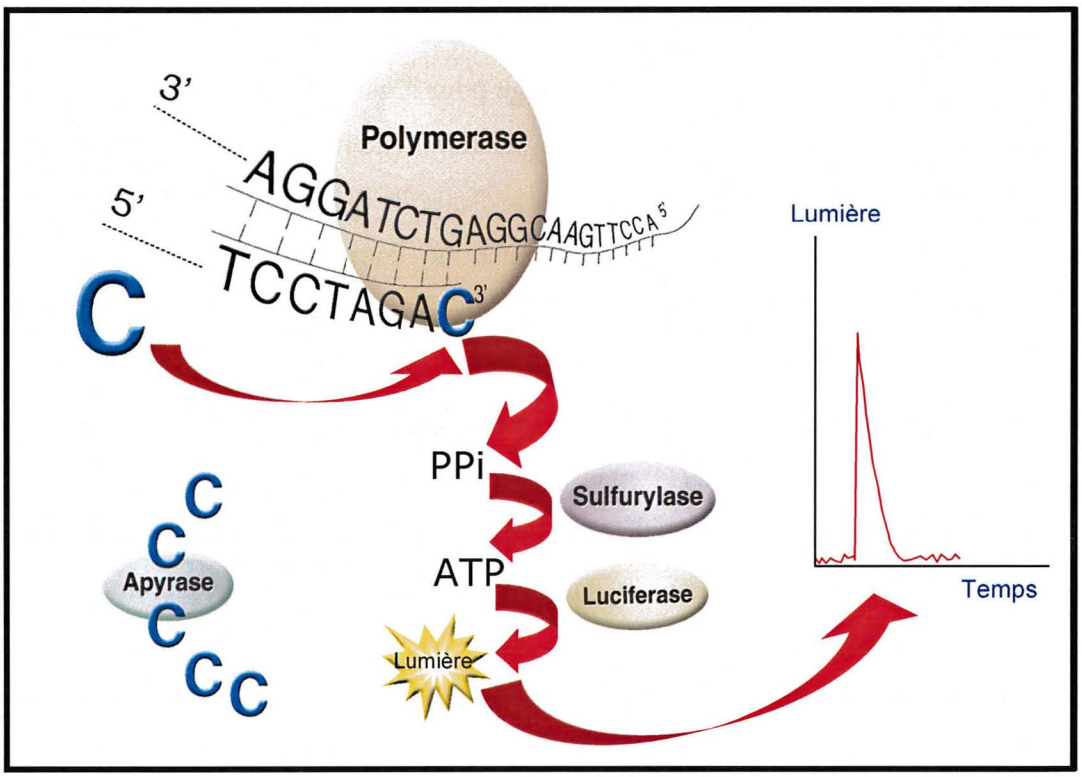


Figure 12. Principe du pyroséquençage.
Le principe de cette méthode consiste à hybrider un amorce (dite amorce de séquence) à un ADN cible (amplifié par PCR et purifié), puis à ajouter de manière séquentielle et dans un ordre défini les bases une par une à partir de l'extrémité 3' de l'amorce. L'incorporation d'une base libère un pyrophosphate (PPi) qui, après transformation, se traduit par un signal mesuré en bioluminescence. La séquence est ensuite déduite en fonction de l'ordre d'incorporation des nucléotides sur l'ADN complémentaire de la cible néosynthétisée.

3 . Le pyroséquençage

Le pyroséquençage est une technique de séquençage par synthèse directe d'oligonucléotides en temps réel (Ahmadian et coll., 2006). Son principe a été décrit en 1985 (Melamede, 1985), toutefois cette technique n'a été publiée qu'en 1998 (Ronaghi et coll., 1998 b).

L'amplification PCR de l'ADN d'intérêt utilise une amorce biotinylée. La purification du brin biotinylé est ensuite réalisée en vue du séquençage. L'analyse par pyroséquençage se déroule en cinq étapes. La première étape correspond à l'hybridation de l'amorce de séquence sur l'ADN simple brin amplifié. Le tout est incubé en présence des différentes enzymes (ADN polymérase, ATP sulfurylase, luciférase et apyrase) et des substrats (adénosine 5' phosphosulfate (APS) et luciférine). Lors de la seconde étape, le dNTP choisi est ajouté à la réaction et l'ADN polymérase catalyse l'incorporation du dNTP au brin d'ADN, s'il est complémentaire à la séquence. Chaque incorporation de dNTP est accompagnée par la libération d'un pyrophosphate (PPi) en quantité équimolaire au nombre de nucléotides incorporés. Pendant la troisième étape, l'ATP sulfurylase convertit les PPi en ATP en présence d'adénosine 5' pyrophosphate. Cet ATP permet la conversion de la luciférine en oxyluciférine par la luciférase, générant alors un signal lumineux proportionnel à la quantité d'ATP (signal capté par une caméra CCD). La hauteur de chaque pic est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés. La quatrième étape permet la dégradation de l'ATP et les dNTP non incorporés par l'apyrase (enzyme de dégradation des nucléotides). Ceci éteint le signal au fur et à mesure et régénère le milieu de réaction. Enfin, les dNTPs suivants sont ajoutés les uns après les autres selon un ordre prédéfini, permettant la synthèse du brin d'ADN complémentaire et la détermination de la séquence en temps réel sous forme d'un pyrogramme (figure 12).
Le pyroséquençage utilise le 2'-déoxyadénosine-5'-O-(1-triphosphate) ou dATPαS à la place du dATP. En effet, ce nucléotide est seulement reconnu par la polymérase, contrairement au dATP qui est reconnu à la fois par la polymérase et la luciférase.

Cette méthode performante, totalement automatisée, est plus sensible et spécifique que le séquençage par la méthode de Sanger, et présente l'avantage d'être beaucoup plus rapide. Mais elle ne permet de séquencer au maximum que 150 pb. Cette limitation est liée à l'inhibition progressive de l'apyrase par l'accumulation de déoxymononucléotide phosphate

(dNMP) et de son produit intermédiaire le déoxydinucléotide phosphate (dNDP) ou à l'élimination incomplète des nucléotides résiduels après lavage. Le pyroséquençage est donc plus adapté pour la recherche de mutations ponctuelles et de polymorphismes qu'au séquençage d'un ADN cible. Ainsi, il est plus particulièrement décrit pour la recherche de mutation du gène *KRAS* dans les cancers colorectaux (Ogino et coll., 2005 ; Poehlmann et coll., 2007).

4 . Génotypage par PCR-ASO

La technique PCR-ASO (Allele Specific Oligonucleotide) utilise des amorces spécialement dessinées pour amplifier uniquement les formes mutées. Il s'agit d'un technique très spécifique. De plus, la PCR multiplex ASO permet la recherche simultanée des mutations les plus fréquentes de l'EGFR. La technique multiplex présente l'avantage de limiter la consommation d'ADN, ce qui peut s'avérer crucial lorsque l'on travaille sur des biopsies bronchiques.

5 . Génotypage par PCR-RFLP

La technique PCR-RFLP (Restriction Fragment Lenght Polymorphism) est basée sur l'analyse des différents fragments de restriction obtenu à partir des produits d'amplification par PCR. La présence de mutations peut générer ou supprimer les sites de restriction, entraînant des modifications du nombre ou de la longueur des fragments de l'ADN digéré. Cette technique est rapide et sensible, et constitue une approche accessible pour la recherche de la délétion de l'exon 19 et de la mutation de l'exon 21 du gène *EGFR* (Pan et coll., 2005). Cependant sa spécificité dépend entièrement de la qualité de la PCR, de la nature de l'enzyme et surtout de sa qualité. En effet, une digestion partielle des produits d'amplification peut faire croire à tort à la coexistence de deux allèles.

6 . Génotypage par PCR en temps réel

6.1 . A l'aide de sondes d'hydrolyse

Les sondes d'hydrolyse ou sondes TaqMan® sont les sondes les plus fréquemment utilisées pour la détection de mutations ponctuelles par PCR quantitative en temps réel. Ces

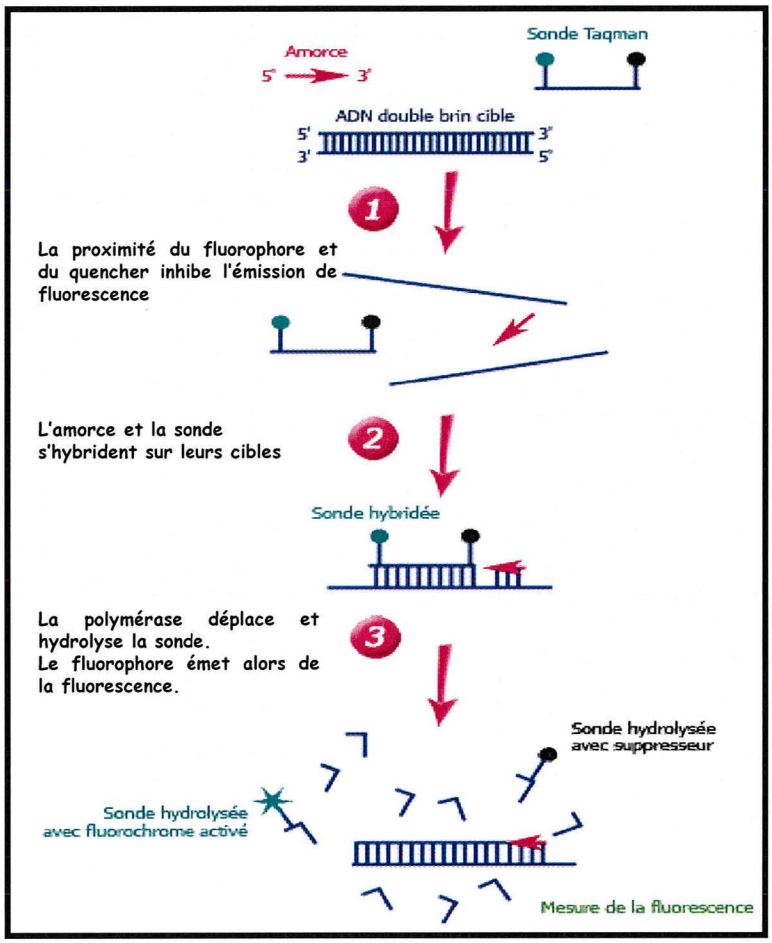


Figure 13. Principe des sondes TaqMan®.

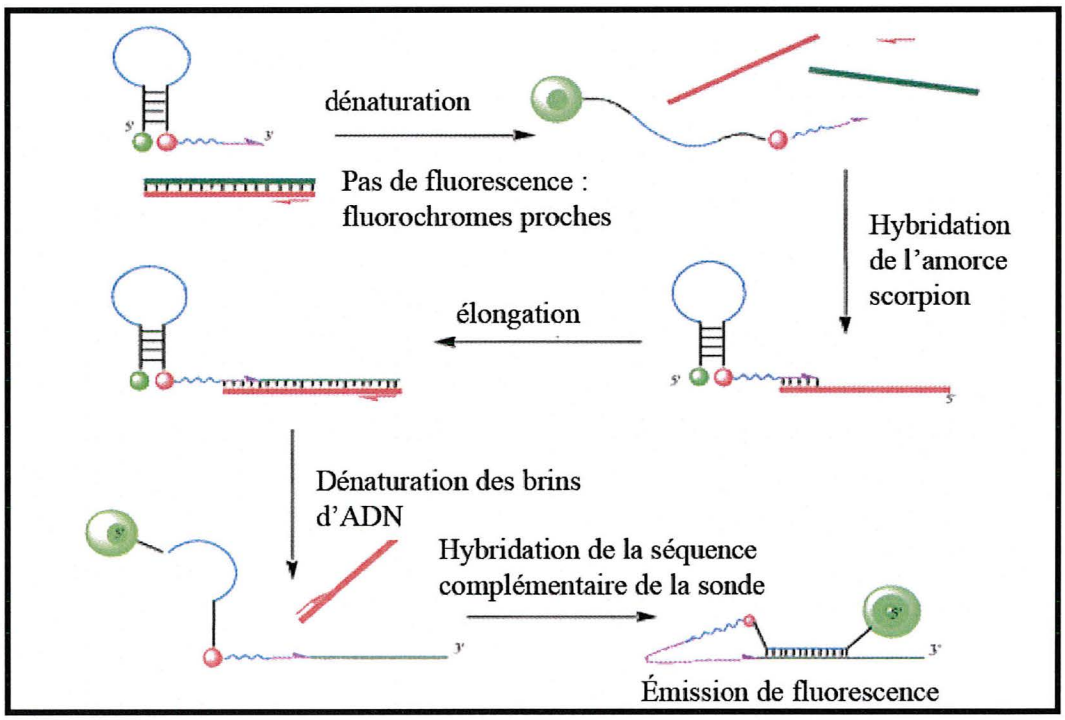


Figure 14. Principe du génotypage utilisant des amorces Scorpions®.

sondes, monobrin et linéaires, sont marquées par deux fluorophores : un à l'extrémité 5' de la sonde fluorophore donneur ou émetteur) et l'autre à l'extrémité 3' (fluorophore extincteur ou *quencher*). Le quencher étant à proximité du donneur inhibe l'émission de fluorescence par ce dernier. Le principe de cette technique est basé sur l'activité 5'-nucléase de l'ADN polymérase : l'enzyme hydrolyse la sonde TaqMan® hybridée à la cible. Le fluorophore donneur alors suffisamment éloigné de l'action du quencher émettra un signal fluorescent, proportionnel à la quantité de produit amplifié au cours de la PCR (figure 13).

Ces techniques sont déjà développées pour la recherche des mutations des gènes *EGFR* et *KRAS*. Les études montrent une bonne sensibilité, une bonne sensibilité et une bonne reproductibilité de la technique (Itabashi et coll., 2003 ; Hilbe et coll., 2003 ; Endo et coll., 2005 ; Lièvre et coll., 2008).

6.2. A l'aide d'amorces Scorpions®

Les amorces Scorpions® se présentent sous forme d'épingle à cheveux. Elles sont composées d'une boucle dont la structure simple brin constitue la séquence spécifique de la cible ADN à étudier, et d'un tronc double brin constitué de deux bras complémentaires situés de chaque côté de la sonde. Un fluorophore émetteur est fixé sur l'extrémité 5' et un *quencher* est fixé sur l'extrémité 3' de l'autre bras. Une molécule d'hexéthylène glycol (HEG) sur laquelle est fixée une amorce est ajoutée juste après le *quencher*. Du fait de sa conformation, l'amorce scorpion n'émet aucun signal de fluorescent. Au cours de la réaction de PCR, la sonde change de structure (éloignement de l'émetteur de son quencher), et conduit, au fur et à mesure de la reconnaissance et de l'hybridation de la sonde à sa séquence complémentaire, à l'émission de fluorescence. La région amorce située juste après l'hexéthylène glycol permet d'intégrer de manière irréversible les fluorophores et la balise moléculaire dans l'amplicon nouvellement synthétisé pendant la réaction de PCR (figure 14). Cette technique présente une grande sensibilité et spécificité, mais la difficulté de design des amorces la rend très onéreuse.

Différentes publications décrivent son utilisation pour la recherche des mutations des gènes *EGFR* et *KRAS* (Clayton et coll., 2000 ; Kimura et coll., 2006 ; Morinaga et coll., 2008 ; Zhang et coll., 2008).

6.3 . Courbe de fusion à haute résolution (High Resolution Melting - HRM)

Cette méthode, réalisée par PCR en temps réel en présence d'un fluorochrome intercalant, est basée sur l'analyse de la forme de la courbe de fusion. Elle permet de discriminer des variations, même d'une seule base sur un fragment de 300 à 500 pb, selon le profil de dénaturation du produit de PCR. Cette méthode sensible, rapide et à faible coût, a été décrite pour la recherche des mutations de *KRAS* et de l'*EGFR* (Krypuy et coll., 2006 ; Do et coll., 2008). Les mutations détectées doivent être identifiées par une autre méthode.

7 . Polymorphisme de conformation simple brin (single strand conformation polymorphism, SSCP)

Cette méthode repose sur le principe que les ADN simple brin présentent une certaine mobilité dans un gel de polyacrylamide non dénaturant. Cette mobilité spécifique résulte de la conformation spatiale de l'ADN simple brin. Ainsi, la présence d'une variation de séquence (mutation ou polymorphisme) altère la conformation spatiale de la molécule, qui se traduit par une variation de migration de l'ADN en gel non dénaturant. La différence de mobilité entre l'ADN normal et l'ADN muté est visible sur le gel, après marquage radioactif des amorces, ou après révélation du gel par coloration à l'argent.

La SSCP est souvent utilisée pour la recherche de polymorphismes ou de mutations connues. Elle a déjà été décrite pour la recherche des mutations des gènes *EGFR* et *KRAS* (Soung et coll., 2005 ; Marchetti et coll., 2005 ; Sonobe et coll., 2005). Cette technique permet l'étude de fragments dont la taille est comprise entre 300 et 400 pb. La bande anormale peut être excisée et analysée par séquençage direct.

8 . Chromatographie liquide haute performance en gradient de dénaturation

Cette technique permet de mettre en évidence une mutation quelconque (substitutions de bases, petites délétions ou insertions) à l'état hétérozygote à partir de produits de PCR séparés par chromatographie liquide haute performance en gradient de dénaturation (*denaturating High Performance Liquid Chromatography*, d-HPLC). Elle peut s'appliquer à l'EGFR dans la mesure où les mutations ne sont pas toutes répertoriées (Jänne et coll., 2006 ;

Cohen et coll., 2006 ; Chin et coll., 2007 ; Sueoka et coll., 2007). Toutefois, elle n'exclut pas le séquençage lorsqu'une mutation est trouvée. L'intérêt de cette technique réside dans le fait qu'elle permet de détecter des mutations connues et inconnues sur des fragments d'ADN de taille supérieure à 500 pb, de façon automatisée, rapide et à faible coût.

TRAVAIL DE THESE

Au cours de mon internat, j'ai dans un premier temps, participé à la mise en place au CHU de Grenoble de la recherche des mutations des gènes *EGFR* et *KRAS* par séquençage direct afin de pouvoir participer au STIC (Soutien aux Techniques Innovantes et Coûteuses) national ERMETIC. Les limites de cette technique nous ont conduit à mettre en place une méthode d'analyse alternative : le pyroséquençage.

Première partie : Le projet ERMETIC

Le STIC ERMETIC (**E**valuation de la **R**echerche des **M**utations de l'**E**GFR pour le **T**raitement par des **I**nbihiteurs de tyrosine kinase des **C**ancers bronchiques non à petites cellules), est un projet multidisciplinaire et multicentrique national initié en 2005. Ce STIC fait intervenir des cliniciens, des pathologistes et des biologistes moléculaires de 15 hôpitaux français, ainsi qu'un centre externe de référence, le laboratoire de Pierre Hainaut, IARC de Lyon.

1 . Le contexte

Les résultats cliniques observés dans le traitement des CBNPC présagent d'une augmentation prochaine et importante de la prescription des TKIs, alors que ces traitements ne permettent d'obtenir des réponses objectives que chez une très faible proportion de malades non sélectionnés (< 10 %), même si un contrôle de la maladie est plus fréquemment observé (40 % des cas). De même, la possibilité de prédire la réponse aux TKIs par la recherche des mutations de l'*EGFR* va également générer un grand nombre de demandes d'examens nouveaux dont les méthodes ne sont pas standardisées, en particulier pour des prélèvements de petites taille inclus en paraffine. De plus, cette recherche ne permet de découvrir une mutation que chez moins de 10 % des malades provenant d'une population non sélectionnée, alors qu'il serait possible d'en augmenter la rentabilité en ne la réalisant que chez les patients sélectionnés sur des critères cliniques ou histologiques simples. L'impact de ces résultats sur la prescription des TKIs de l'EGFR, par rapport à une prescription fondée sur des critères cliniques, anatomopathologiques ou biologiques (expression de l'EGFR et de pAKT, polysomie/amplification du gène *EGFR*, mutations de *KRAS*), n'est pas connu. Enfin,

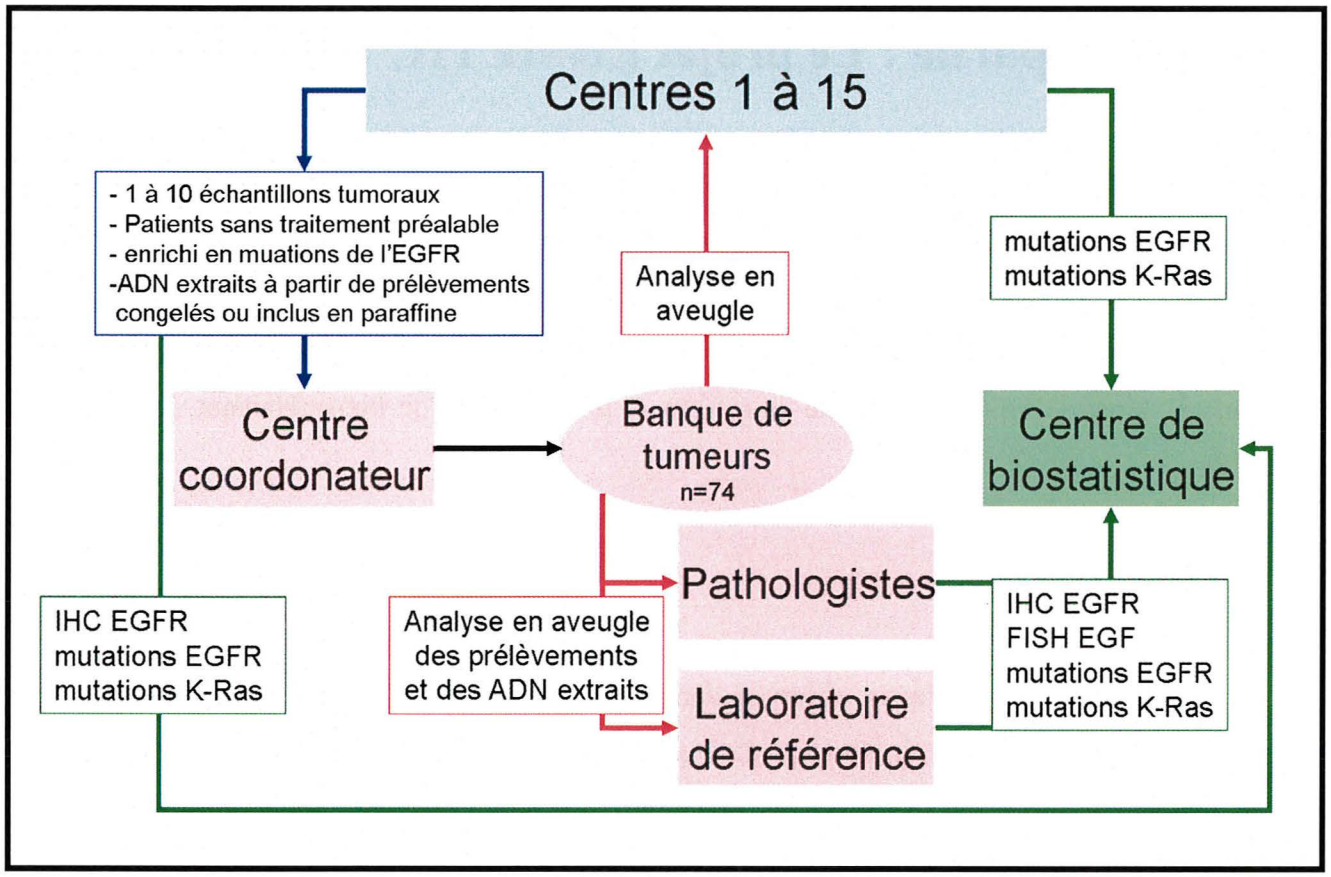


Figure 15. Organisation de l'étude rétrospective du projet ERMETIC
Chaque centre a sélectionné des échantillons, constituant ainsi un panel de 74 prélèvements. Les recherches de mutations, à partir des prélèvements inclus en paraffine, ont été réalisées par tous les centres. Le centre de référence a réalisé les analyses à partir des prélèvements inclus en paraffine et congelés.

l'impact médico-économique de l'introduction des TKIs et de la recherche des mutations de l'*EGFR* n'a été que très peu évalué.

2 . Les objectifs du projet ERMETIC

Dans ce contexte, le projet ERMETIC se propose de répondre à trois objectifs.

1) Valider le **séquençage direct** des **exons 18 à 21** de l'***EGFR*** et les autres méthodes d'identification des altérations moléculaires de l'*EGFR* et de *KRAS* à partir de **prélèvements rétrospectifs de petites tailles, inclus en paraffine**, réalisés par les différents laboratoires français participant au projet.

2) **Déterminer et comparer les différents facteurs prédictifs de réponse** et de bénéfice clinique aux TKIs de l'EGFR à partir d'une **cohorte prospective** de malades porteurs d'un CBNPC de stade IIIB-IV afin d'établir les conditions d'une meilleure prescription de la recherche des mutations de l'*EGFR* et confirmer la pertinence de ces facteurs à partir d'un **échantillon de validation**.

3) Déterminer la ou les meilleures **stratégies de prescription** de la recherche des mutations de l'*EGFR* en terme de **coût-efficacité**.

3 . L'étude rétrospective

L'objectif principal de l'étude était de valider la recherche des mutations de l'*EGFR* et de *KRAS* par séquençage direct selon la méthode de Lynch et coll. (2004), pour chacun des 15 centres participant au projet. Cette étude a été réalisée sur une cohorte rétrospective de 74 patients pour lesquels un échantillon tumoral congelé, un échantillon tumoral fixé et inclus en paraffine et une biopsie avaient été conservés (figure 15). Ces échantillons ont été sélectionnés pour être enrichis en mutations. Ainsi, sur les 74 prélèvements, 56 proviennent de femmes (76 %) et 18 d'hommes (24 %), n'ayant jamais été traités par des TKIs. D'un point de vue histologique, 53 échantillons sont des adénocarcinomes (72 %), 11 des carcinomes squameux (15 %) et 10 des carcinomes à grandes cellules (13%). Enfin, 12 prélèvements ont des mutations de l'*EGFR* connues (16 %) et 38 sont des adénocarcinomes de patients non-fumeur (72%).

Un contrôle de qualité externe (Gold Standard), constitué par le séquençage des exons 18 à 21 de l'EGFR et de KRAS sur les prélèvements cryopréservés du panel, a été établi par le laboratoire de Pierre Hainaut, IARC de Lyon.

Par ailleurs, les anatomopathologistes ont validé les techniques et la lecture des différents marqueurs étudiés en immunohistochimie (IHC) (EGFR, pAKT, HER2) et en hybridation *in situ* fluorescente (FISH) (EGFR).

Seuls les résultats concernant l'identification des altérations moléculaires de l'*EGFR* et de *KRAS* seront présentés dans ce mémoire.

A Grenoble, la recherche des mutations de l'*EGFR* et de *KRAS* a été réalisée par séquençage direct.

Sur 74 échantillons, nous avons déterminé le statut mutationnel des 5 exons analysés (exons 18 à 21 de l'*EGFR* et exon 1 de *KRAS*) pour 46 prélèvements (62 %) et celui de 4 exons sur 5 pour 13 prélèvements (18%). Dans un certain nombre de cas, l'ADN n'était pas amplifiable ou la séquence n'était pas analysable (exon 18 : 19/74 (25,7 %) ; exon 19 : 12/74 (16,2 %) ; exon 20 : 8/74 (10,8 %) ; exon 21 : 3/74 (4,1 %) et *KRAS* : 9/74 (12,1 %)).

Aucune mutation n'a été détectée pour les exons 18 et 20 de l'*EGFR*. En revanche, 10 délétions de l'exon 19, 4 mutations (L858R) de l'exon 21 et 8 mutations de *KRAS* ont été trouvées (tableau IX). La majorité des mutations de *KRAS* se situe sur le codon 12 de l'exon 1, une seule mutation est détectée sur le codon 13 de l'exon 1.

Tableau IX. Résultats des mutations et délétions détectées à Grenoble sur la cohorte rétrospective constituée de 74 prélèvements.

Exon 19	Fréquence observée
c.2235_2249del ; p.Glu746_Ala750del	5
c.2236_2250del ; p.Glu746_Ala750del	2
C2240_2251del ; p.Leu747_Ala750del	1
c.2240_2257del ; p.Leu747_Pro753delinsSer	1
Exon 21	
c.2573T>G ; p.Leu858Arg	4
KRAS	
c.35G>A ; p.Gly12Asp	1
c.34G>T ; p.Gly12Cys	6
c.38G>T ; p.Gly13Val	1

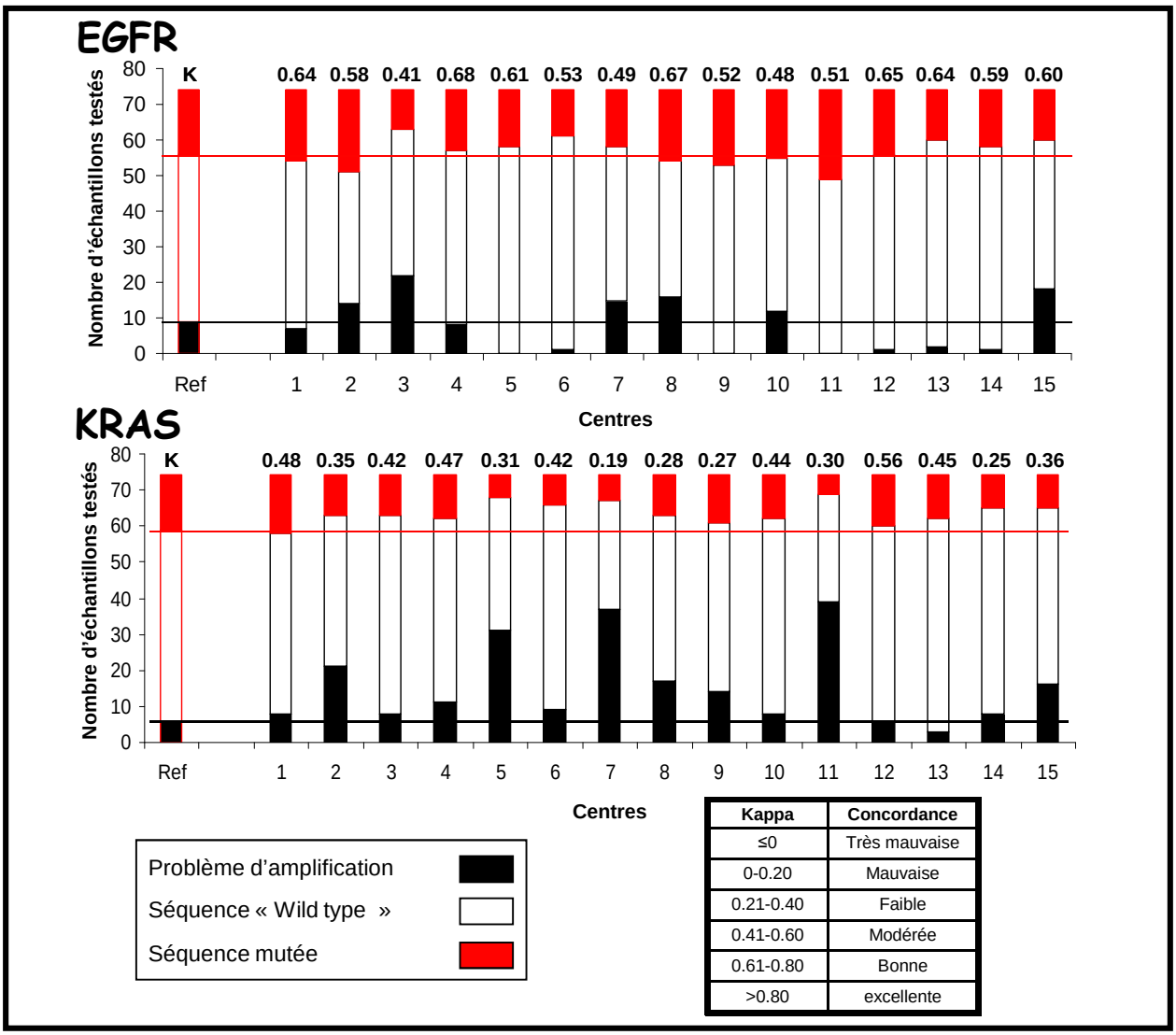


Figure 16. Résultats obtenus par les différents centres pour la recherche des mutations de l'EGFR et de KRAS, en comparaison aux résultats obtenus par le centre de référence, sur les prélèvements congelés.

Grenoble est le centre 6. Le coefficient kappa (K) évalue la concordance entre les résultats du centre qui a réalisé les analyses et ceux du centre de référence.

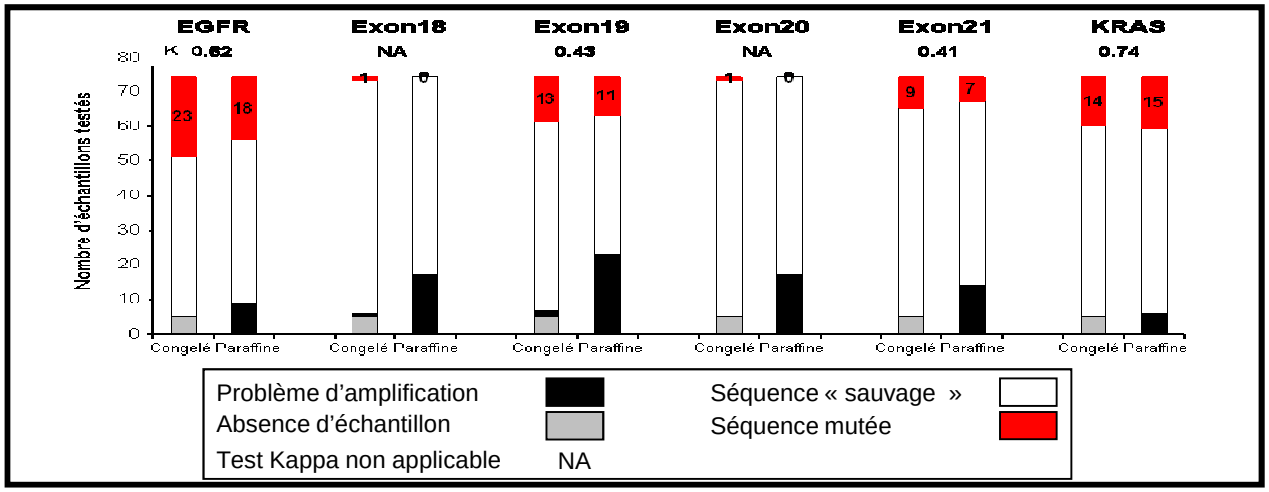


Figure 17. Comparaison des résultats obtenus par le centre de référence à partir des échantillons congelés et inclus en paraffine.

Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus par le centre de référence à partir de prélèvements congelés (1 mutation de l'exon 18, 12 délétions de l'exon 19, 10 mutations de l'exon 21 et 12 mutations de *KRAS*) (figure 16). La concordance entre les résultats obtenus pour chaque centre et ceux du centre de référence a été évaluée par le coefficient kappa. Plus le coefficient kappa est proche de 1 plus la concordance est bonne. Pour la recherche des mutations de l'*EGFR*, 60 % des centres ont une concordance modérée et 40 % présentent une bonne concordance. En ce qui concerne la recherche pour *KRAS*, 6,6 % des centres présentent une mauvaise concordance, 46,7 % une faible concordance et 46,7 % une concordance modérée. A Grenoble, la concordance est bonne pour l'*EGFR* et modérée pour *KRAS*. Il faut cependant noter que cette concordance est évaluée sur des résultats obtenus à partir de deux prélèvements différents (congelé et inclus en paraffine). Les résultats obtenus par le centre de référence à partir des échantillons inclus en paraffine diffèrent également de ceux obtenus sur les prélèvements congelés et sont plus en accord avec les résultats obtenus par les différents centres (figure 17).

L'ensemble de ces analyses a fait l'objet d'une présentation au congrès international de l'IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer) en 2007 (annexe IV).

En janvier 2007, tous les centres ERMETIC ont été validés pour la recherche des mutations de l'*EGFR* et de *KRAS* par séquençage direct, et l'étude prospective a débuté.

4 . L'étude prospective

Le deuxième objectif du projet ERMETIC visait à établir les conditions d'une meilleure prescription de la recherche des mutations de l'*EGFR*. Pour se faire, la recherche des mutations de l'*EGFR* a été réalisée par séquençage direct en conditions réelles, c'est-à-dire tenant compte de l'accessibilité, de la qualité de conservation des prélèvements et de la petite taille des biopsies, sur une cohorte prospective de malades traités par TKIs.

Les patients inclus dans l'étude sont des malades porteurs d'un CBNPC histologiquement ou cytologiquement prouvé, qui bénéficient d'une monothérapie par TKI de l'EGFR pour la première fois et qui sont suivis dans les différents services cliniques participant au projet ERMETIC. Au moment de l'inclusion le clinicien devait recueillir un certain nombre de données épidémiologiques (race, âge, sexe, tabagisme), de données concernant le malade et la tumeur (état général, type histologique OMS, stade TNM au diagnostic et au moment du traitement par TKI, sites des métastases), des données sur ses traitements antérieurs (chirurgie,

Patient	EGFR				KRAS
	Exon 18	Exon 19	Exon 20	Exon 21	Exon 1
1	Non amplifiable	sauvage	Sauvage	sauvage	Muté c.35G>T ; p.Gly12Val
2	Non amplifiable	sauvage	Sauvage	sauvage	sauvage
3	Non amplifiable	Non interprétable	Sauvage	Sauvage	Muté c.35G>T ; p.Gly12Val
4	Non amplifiable	Sauvage	Sauvage	Sauvage	Muté c.35G>T ; p.Gly12Val
5	Non amplifiable	Non interprétable	Sauvage	Non interprétable	Muté c.35G>T ; p.Gly12Val
6	Non amplifiable	Non amplifiable	Non interprétable	Non interprétable	Non amplifiable
7	Non amplifiable	Non interprétable	Non amplifiable	Non amplifiable	Non amplifiable
8	Non amplifiable	Non amplifiable	Sauvage	Sauvage	Sauvage
9	Non amplifiable	Sauvage	Sauvage	Non interprétable	Sauvage
10	Non amplifiable	Sauvage	Sauvage	Sauvage	Sauvage
11	Non amplifiable	Non interprétable	Non interprétable	Sauvage	Sauvage
12	Non amplifiable	Non amplifiable	Sauvage	Non interprétable	Sauvage
13	Pas de prélèvement				
14	Pas de prélèvement				
15	Pas de prélèvement				
16	Pas de prélèvement				
17	Pas de prélèvement				

Tableau X. Statut mutationnel de l'*EGFR* et *KRAS* des 17 patients grenoblois inclus dans l'étude prospective.

radiothérapie thoracique, chimiothérapies) et des données sur le traitement par TKI (nom du TKI, motif du traitement, …).
La nature du TKI, les conditions de sa prescription (ATU nominative, ATU de cohorte, AMM, essai thérapeutique institutionnel ou industriel) et sa durée n'étaient pas des facteurs importants. Le suivi a été fait selon les recommandations de chaque Unité de Concertation à condition qu'elles incluent chez les malades traités un suivi minimal trimestriel évaluant la tolérance et l'efficacité thérapeutique. Les données analysées sont la réponse aux TKIs, la survie sans progression sous TKI, ainsi que la survie globale des patients.

Cette étude prospective, débutée le 1er mars 2007 et clôturée le 31 mars 2008, a inclus 507 patients atteints de CBNPC. Dix-sept patients ont été inclus au CHU de Grenoble (tableau X). Sur ces 17 inclusions, la recherche des mutations de l'*EGFR* et de *KRAS* n'a pu être réalisée que pour 12 patients. Les 5 autres prélèvements étaient de trop petite taille pour être analysés. Parmi les 12 prélèvements analysables, 2 n'ont donné aucun résultat. Quatre échantillons ont présenté des mutations de *KRAS*. Alors qu'aucune mutation de l'*EGFR* n'a été détectée. Il faut toutefois notée que de nombreuses séquences n'ont pas pu être amplifiées ou interprétées, due à une faible quantité ou à une mauvaise qualité de l'ADN.

Au niveau national, les résultats de cette étude prospective sont en cours d'évaluation.

5 . Discussion des résultats de l'étude ERMETIC

Cette première partie de mon travail de thèse a permis la mise en place de la recherche des mutations de l'*EGFR* et de *KRAS* par séquençage direct, au CHU de Grenoble.
L'analyse de la cohorte rétrospective a mis en évidence une grande disparité des résultats obtenus à partir de prélèvements congelés et inclus en paraffine. Pour les échantillons congelés (ADN extrait de bonne qualité), la quasi-totalité des analyses a pu être réalisée, seuls deux échantillons n'ont pas donné de résultats pour l'exon 19. Un plus grand nombre de mutations (20 %) a été mis en évidence dans ces échantillons. Les fixateurs altèrent la qualité et l'intégrité de l'ADN. Ainsi, certains d'entre eux comme le liquide de Bouin ou les fixateurs contenant de l'acide picrique sont proscrits. L'AFA (Alcool-Formol-acide Acétique) semble également altérer l'ADN de manière importante et interfère avec les analyses de biologie moléculaire. Les résultats obtenus à partir d'échantillons inclus en paraffine étaient toutefois

concordants entre les différents centres, ce qui a conduit à la validation de la méthode de séquençage direct pour tous les centres.

Cependant, cette technique de référence est coûteuse, relativement longue en terme de délai de rendu de résultat et peu sensible lorsque la quantité d'ADN muté présente dans l'échantillon est faible (< 25 %). Nous avons donc choisi de développer une méthode alternative de recherche des mutations de *KRAS* et de l'*EGFR* par pyroséquençage.

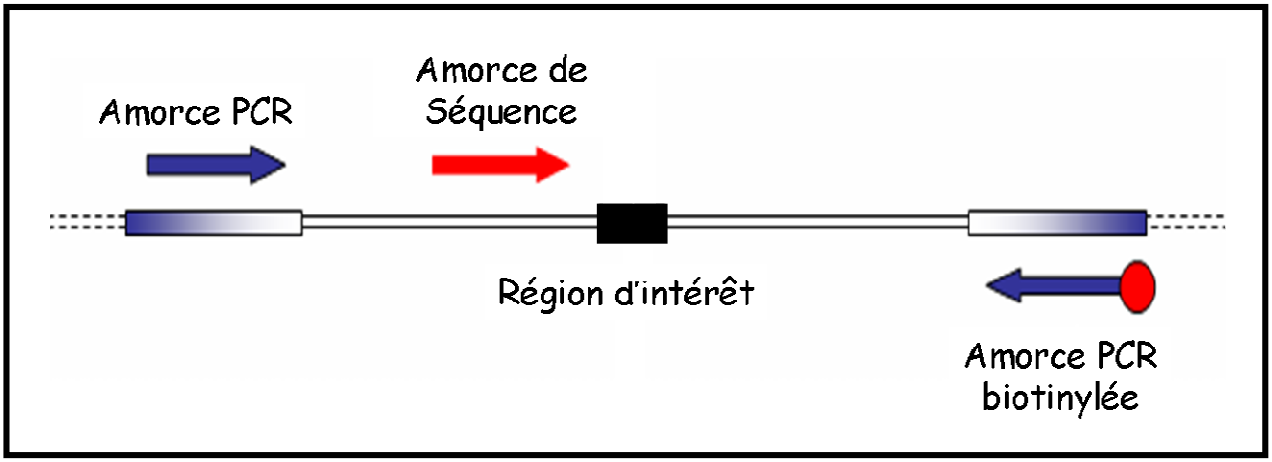


Figure 18. Disposition des trois amorces nécessaires pour l'analyse par pyroséquençage. L'amplification PCR de la région d'intérêt est réalisée avec une amorce biotinylée, permettant ensuite la purification du brin l'ADN à séquencer. L'analyse est ensuite réalisée après hybridation de l'amorce de séquence.

Deuxième partie : Mise au point de la recherche des mutations par pyroséquençage

Dans le cadre du financement de la plateforme INCa de génomique moléculaire somatique des cancers, notre laboratoire a fait l'acquisition d'un pyroséquenceur. Cette technologie est adaptée à la recherche de SNP ou mutation connues. Nous avons donc développé des techniques pour analyser les mutations des codons 12 et 13 de l'exon 1 de *KRAS*, la mutation L858R de l'exon 21 de l'*EGFR*, la mutation de résistance T790M de l'exon 20 de l'*EGFR* et la délétion LREA de l'exon 19 de l'*EGFR*.

1 . Démarche suivie pour la mise au point

Dans un premier temps, nous avons défini les trois amorces nécessaires (deux amorces de PCR dont une biotinylée et une amorce de séquence) avec le logiciel PSQ Assay Design™ fourni avec le pyroséquenceur (PyroMark ID, Biotage AB) (figure 18). Nous avons ensuite mis au point l'amplification PCR des différentes séquences d'intérêt. Pour cela, nous avons déterminé la température d'hybridation des amorces ainsi que la concentration en chlorure de magnésium ($MgCl_2$) optimales pour l'obtention d'un produit PCR analysable. La température d'hybridation dépend de la composition des amorces et doit être suffisamment élevée pour permettre l'hybridation spécifique des amorces sur l'ADN cible. Le cation Mg^{2+} est quant à lui indispensable au bon fonctionnement de la polymérase et à l'incorporation correcte des dNTP. Enfin, nous avons déterminé l'ordre de distribution des nucléotides pour chaque exon, à l'aide du logiciel d'analyse Pyromark™ ID (Biotage AB).

Afin de valider ces méthodes de recherche des mutations, nous avons utilisé différentes lignées ayant une mutation connue, ainsi que des échantillons tumoraux congelés ou fixés et inclus en paraffine, préalablement analysés par séquençage direct. Nous avons également testé la sensibilité de la technique à l'aide de dilutions de l'ADN muté avec un ADN sauvage provenant de lymphocytes sanguins (Buffy Coat : BC).

2 . Recherche des mutations du gène *KRAS*

La modification de l'AMM du cetuximab et du panitumumab rend obligatoire, avant leur prescription chez les patients porteurs d'un cancer colorectal métastatique, la recherche du statut mutationnel de *KRAS*. Elle se fait sur différents types de prélèvements (tumeurs ou biopsies) fixés avec différents types de fixateurs (Formol, AFA (Alcool-Formol-acide Acétique, Excel+, …) et inclus en paraffine. Nous avons testé le kit commercial proposé par la société Biotage pour la recherche des mutations de *KRAS* par pyroséquençage et n'avons pas obtenu d'amplification PCR à partir de ces prélèvements.
Nous avons donc développé une méthode d'analyse des mutations du gène *KRAS*, couplant une PCR nichée au pyroséquençage.

L'ensemble de ces résultats fait l'objet d'une communication brève en cours de soumission.

Pyrosequencing method to detect *KRAS* mutation in formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissues

Running head: Analysis of *KRAS* mutation using pyrosequencing

Sandrine Dufort[1,2], Marie-Jeanne Richard[1,2] and Florence de Fraipont[1,2] *

1: UF Cancérologie Biologique et Biothérapie, pôle Biologie, CHU Grenoble, France

2: INSERM U823, Université Joseph Fourier, Grenoble, France

* Corresponding author: Florence de Fraipont

UF Cancérologie Biologique et Biothérapie, CHU Grenoble

DBI, pavillon B

38 043 La Tronche

tel.: 04 76 76 54 84

fax: 04 76 76 56 64

fdefraipont@chu-grenoble.fr

Keywords: metastatic colorectal cancer, anti-EGFR antibodies, *KRAS*, mutation, pyrosequencing

Human gene: *KRAS*: v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

Abstract:

Background: *KRAS* mutation status has been reported to be a predictive marker of tumor response to EGFR inhibitors.

Method: We designed a pyrosequencing assay based on nested PCR to characterize *KRAS* mutation status using formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue.

Results: Mutant and wild-type *KRAS* cell lines were used to determine the specificity and the sensitivity (detection limit, approximately 5% mutant alleles) of the method. The results obtained for tumor samples were 95% comparable to those obtained by dideoxy sequencing.

Conclusion: Analysis of *KRAS* mutation using nested PCR and pyrosequencing is a simple, robust, fast and sensitive method that can be used with formalin-fixed and paraffin-embedded tissue.

Colorectal cancer is the second ranked cause of cancer death in both the United States and the European Union. Significant improvements in patient survival after metastasis development have been made by the development of new therapies. One of the most promising targets is the inhibition of the epidermal growth factor receptor (EGFR) by monoclonal antibodies (cetuximab and panitumumab). However, the mutation of the *KRAS* gene has recently been shown to be highly predictive of the response to anti-epidermal growth factor receptor antibodies in metastatic colorectal cancer (1, 2). Indeed, Ras proteins are among the best studied in cancer biology. They are transiently activated by signals from cell surface receptors and then activate a diverse set of signaling cascades implicated in cell proliferation and survival. *KRAS* oncogene harbors single point mutations at positions 1 and 2 of codons 12 and 13 (exon 1), resulting in a constitutively activated protein (3). Consequently, when *KRAS* is mutated, tumor cells do not respond to anti-EGFR antibodies. Both the FDA (Food and Drug Administration) and the EMEA (European Medicines Agency) require knowledge of *KRAS* status before drug administration. This analysis must be conducted on biopsies or more frequently on paraffin-embedded archival tumor tissues using molecular biology techniques. As the DNA quality and integrity could be largely drawn by fixatives (4), the molecular biology techniques used must be specific but also sensitive and adjusted to degraded DNA.

This paper describes a sensitive pyrosequencing method to analyze *KRAS* mutation (Figure 1A). DNA was extracted from tumor samples using the QIAmp DNA mini Kit (Qiagen) after the removal of paraffin by xylene extraction and 48 h of proteinase K digestion at 56°C. This long digestion time releases amplifiable nucleic acids by reversing formalin-induced cross-links (5). To validate our technique, we obtained 57 consecutive tumor DNA where KRAS was characterized for diagnostic use by classical BigDye Terminator sequencing (Applied Biosystems). There is no informed consent from the individuals concerned but the analyses were conducted with full respect for the individuals' right to confidentiality and according to

procedures supervised by local authorities responsible for ethical research. As controls, we also used DNA isolated from known mutant cell lines A549, SW480 (a generous gift from V. Combaret), LoVo and LS174T (a generous gift from M.-P. Buisine); DNA extracted from human peripheral blood lymphocytes (BC) was used as wild-type control.

DNA (10 ng of cell DNA or 100 ng of tumor DNA) was amplified using a nested PCR with four primers (I-F, I-R, PS-F and PS-R) (Figure 1A). The first 205-bp PCR product was amplified at 58°C for 30 cycles. The second PCR procedure was carried out in a total volume of 50 µl containing 2 µl of the first PCR, 20 pmol of each primer, 1.5 mmol/l $MgCl_2$ and 1.25 U of FastStart Taq DNA polymerase (Roche, Meylan, France). PCR conditions consisted of initial denaturing at 95°C for 15 min, 45 cycles at 95°C for 20 s, 65°C for 20 s, and 72°C for 20 s and a final extension at 72°C for 10 min. The PCR products (10 µl) were analyzed by electrophoresis in a 3% agarose gel to confirm successful amplification of a 79-bp PCR product. The other 40 µl of PCR product were bound to streptavidin Sepharose HP (GE Healthcare), purified, washed, denatured using a 0.2-mol/l NaOH solution, and washed again. Then 0.3 µmol/l pyrosequencing primer (PS-seq) was annealed to the purified single-stranded PCR product and pyrosequencing was done on a PyroMark ID system (Biotage AB) following the manufacturer's instructions (6). The nucleotide dispensation order was ACTGCTGAGCGTAG to analyze position 1 of codons 12 and 13 and TACGACTCAGATGCGTAG to analyze position 2 of codons 12 and 13.

Cancer cell lines with known *KRAS* mutations were first used to validate the pyrosequencing methodology (Figure 1B). We detected the known homozygote c.34G>A; p.Gly12Ser mutation in A549 cells (96.4%), the homozygote c.35G>T; p.Gly12Val mutation in SW480 cells (91%), the heterozygote c.35G>A; p.Gly12Asp mutation in LS174T cells (47.7%) and the heterozygote c.38G>A; p.Gly13Asp mutation in LoVo cells (43.6%). We tested the reproducibility by analyzing each cell line in five consecutive runs and determining the

amount of mutated alleles (Figure 1C). The relative standard deviation (RSD) varied from 2.2% to 7.3%. To demonstrate assay precision, we also quantified *KRAS* mutant alleles in the various mixtures (100%, 50%, 25%, 12%, 6%, 3%, 0%) of DNA from a *KRAS* mutated cell line and DNA from peripheral blood lymphocytes (Figure 1C). This cell line dilution assay indicates that 5% of tumor cell line DNA in a background of normal DNA could be detected. This will allow confident screening for mutation in samples that have at least 10% tumor cells. The repeatability was analyzed with one tumor sample presenting a c.35G>T; p.Gly12Val mutation. In the same run, we amplified and analyzed by pyrosequencing this DNA ten times. The same results were obtained in all samples with a mutation detected at 30.8 ± 2.1% (RSD = 6.8%).

We next compared the results obtained previously by BigDye Terminator sequencing (reference method) and those obtained by pyrosequencing on 57 tumor samples (Table 1). All mutated samples were confirmed twice, starting from independent polymerase chain reactions. The *KRAS* mutation was found in 17 out of 57 (30%) and in 20 out of 57 (35%) tumors. These results are in accordance with the literature, where *KRAS* mutation frequency ranges between 30% and 40% (7, 8). This frequency also varies according to tumor type (40% in hereditary non polyposis colorectal cancer (HNPCC) and 32% in sporadic colorectal cancer) (9). When we compared the results obtained by pyrosequencing with those of classical dideoxy sequencing, we obtained concordance in 54 out of 57 samples (95%). For only three tumors was a mutation detected by pyrosequencing but not by BigDye Terminator sequencing, which was directly related to the difference in sensitivity between the two methods. We obtained the same results as those described by Ogino et al. (10), a study which used a different pyrosequencing method. They developed an assay using whole-genome amplified DNA from paraffin-embedded tissue. They demonstrated that pyrosequencing has a higher analytical sensitivity (approximately 5%) than dideoxy sequencing (approximately 20%). Another

pyrosequencing method has been published by Poehlmann et al. (11). They only tested fresh frozen tissues and can only analyze position 2 of codons 12 and 13.

A sensitive method based on HRM (high-resolution melting) analysis to characterize *KRAS* mutations has recently been described (12, 13). The sensitivity was similar (5%–6%) to what we observed with pyrosequencing, but it is a screening methodology and must be combined with dideoxy sequencing for mutation identification.

In conclusion, we have presented a robust assay for screening and identifying mutations on both positions 1 and 2 of the *KRAS* codons 12 and 13. This assay is directly applicable on formalin-fixed and paraffin-embedded clinical tissues. This method is more sensitive, less time-consuming and less expensive than classical sequencing (14).

Acknowledgments:

We thank Valérie Combaret (Centre Lyon Berrard, Lyon, France) and Marie-Pierre Buisine (CHU de Lille, France) for their generous gift. Excellent technical support was provided by Valérie Konik-Mathevet, Maryse Samuel, Odile Vermeulen and Emilie Morel. We also acknowledge the Department of Cytology and Pathology for tumor sample preparation. This project was supported by INCa (the French National Cancer Institute).

References:

1. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2008;26:1626-34.
2. Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. J Clin Oncol 2008;26:374-9.
3. Kranenburg O. The KRAS oncogene: past, present, and future. Biochim Biophys Acta 2005;1756:81-2.
4. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. Am J Pathol 2002;161:1961-71.
5. Gilbert MT, Haselkorn T, Bunce M, Sanchez JJ, Lucas SB, Jewell LD, et al. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? PLoS ONE 2007;2:e537.
6. Ronaghi M, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P. PCR-introduced loop structure as primer in DNA sequencing. Biotechniques 1998;25:876-8, 80-2, 84.
7. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. Cancer Res 1989;49:4682-9.
8. Brink M, de Goeij AF, Weijenberg MP, Roemen GM, Lentjes MH, Pachen MM, et al. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. Carcinogenesis 2003;24:703-10.
9. Oliveira C, Westra JL, Arango D, Ollikainen M, Domingo E, Ferreira A, et al. Distinct patterns of KRAS mutations in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status. Hum Mol Genet 2004;13:2303-11.

10. Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Yan L, Cantor M, Namgyal C, et al. Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. J Mol Diagn 2005;7:413-21.

11. Poehlmann A, Kuester D, Meyer F, Lippert H, Roessner A, Schneider-Stock R. K-ras mutation detection in colorectal cancer using the Pyrosequencing technique. Pathol Res Pract 2007;203:489-97.

12. Do H, Krypuy M, Mitchell PL, Fox SB, Dobrovic A. High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. BMC Cancer 2008;8:142.

13. Krypuy M, Newnham GM, Thomas DM, Conron M, Dobrovic A. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. BMC Cancer 2006;6:295.

14. Tan YH, Liu Y, Eu KW, Ang PW, Li WQ, Salto-Tellez M, et al. Detection of BRAF V600E mutation by pyrosequencing. Pathology 2008;40:295-8.

Table 1: *KRAS* status (wild type or mutant) determined by classical dideoxy sequencing or by pyrosequencing on 57 colon cancer tissues

Results of dideoxy sequencing / Results of pyrosequencing	Wild type	Mutant
Wild type	37	0
Mutant	3	17*

*: for each sample the same mutation was detected by the two methods

Figure 1: *KRAS* pyrosequencing assay

Figure 1A: Design. PCR with I-F and I-R primers amplifies a first segment of *KRAS* exon 1 containing codons 12 and 13 (black box). The PS-F and PS-R primers were used for the second PCR and PS-R was biotinylated. The (PS-seq) pyrosequencing primer can detect common codon 12 (positions 1 and 2) and codon 13 (positions 1 and 2) mutations (black box).

Figure 1B: Examples of pyrograms obtained when position 1 was analyzed on human blood lymphocyte (BC) and A549 cells or position 2 on BC, SW480, LoVo and LS174T cells.

Figure 1C: Test of pyrosequencing sensitivity by BC and mutant cell line DNA mixtures: *these results correspond to five independent analyses of the same sample.

A

I-F

GACATGTTCTAATATAGTCACATTTTCATTATTTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGA

PS-F

PS-seq

12 13

1 2 3 1 2 3

CTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGA

PS-R

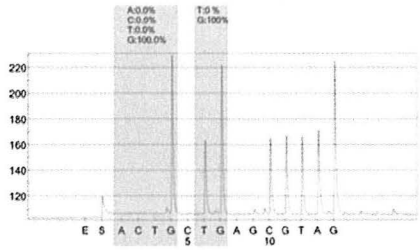
TACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAATCTT

I-R

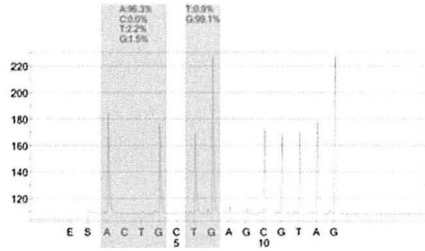
GTTTTAATATGCATATTACTGGTGCAGGAC

B

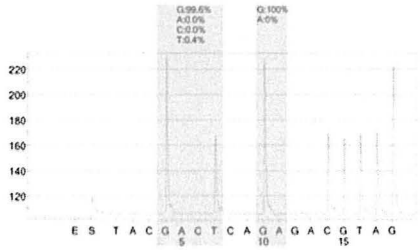
BC



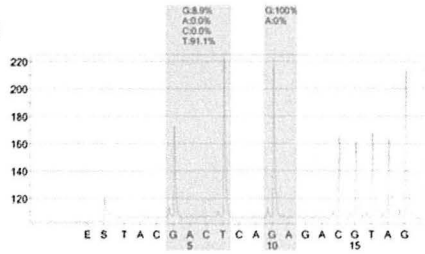
A549



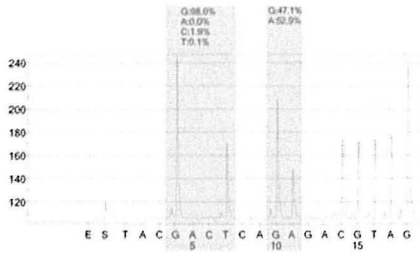
BC



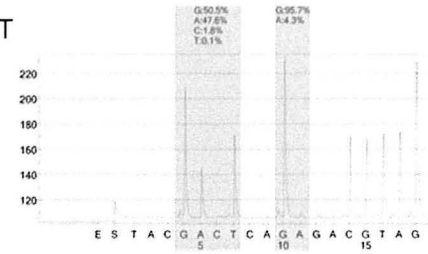
Sw480



LoVo



LS174T



C

Proportion of mutated/ wild-type DNA	100 / 0*	50 / 50	25 / 75	12 / 88	6 / 94	3 / 97	0 / 100
A549	96.4 ±2.1%	58.1	29.8	17.7	9.4	4.9	1.2
SW480	91 ± 2.1 %	47	24.5	15.8	7.9	2.4	3.9
LoVo	47.7 ± 3.5%	33.7	22	9.6	6.2	4.2	0
LS174T	43.6 ± 3 %	36.3	26.4	15.9	7.5	5.2	1.1

3 . Discussion de l'analyse du statut de *KRAS* par pyroséquençage

Nous avons développé une méthode simple, robuste et sensible de séquençage pour la détection des mutations de *KRAS*. Elle est adaptée aux échantillons fixés et inclus en paraffine car la PCR nichée permet une amplification plus importante et plus spécifique de la séquence à analyser. Nous avons ainsi montré que le pyroséquençage avait une meilleure sensibilité analytique (meilleure limite de détection : 5 %) que le séquençage direct quelque soit la mutation de *KRAS* analysée.

La comparaison des résultats obtenus par séquençage direct et par pyroséquençage montre une bonne concordance (95 %) entre les deux méthodes. Toutefois, comme le pyroséquençage est plus sensible, il a permis de déterminer trois mutations qui n'avaient pas été identifiées par le séquençage direct. Dans cette étude, nous avons déterminé que 35 % des échantillons été mutés, ce qui est en accord avec les chiffres rapportés dans la littérature (*KRAS* muté dans 30 à 40 % des cancers colorectaux) (Forbes et coll., 2006). De plus, la répartition des mutations des codons 12 et 13 est également similaire à celle décrite par la littérature (Forbes et coll., 2006). Le codon 12 est muté dans 90 % des cas (*versus* 83 % dans la littérature) et le codon 13 est muté des 10 % des cas (*versus* 17 %).

L'analyse des mutations de *KRAS* par pyroséquençage a déjà fait l'objet deux publications. La méthode développée par Ogino et coll. (2005) est applicable aux échantillons inclus en paraffine et permet la détermination de toutes les mutations des codons 12 et 13, mais elle utilise différentes amorces de séquence selon les mutations recherchées. D'autre part, la méthode utilisée par Poehlmann et coll. (2007), n'a été testée que sur des échantillons congelés et permet d'analyser uniquement les positions 2 des codons 12 et 13. Notre technique, qui utilise une seule amorce de séquence, est plus simple d'utilisation et surtout elle permet l'identification des mutations des positions 1 et 2 des codons 12 et 13 à partir de tous types de prélèvements (congelés et inclus en paraffine).

La mise en place du STIC MOKAECM (évaluation de la détection des **M**utations de l'**O**ncogène **K**RAS pour le traitement par les **A**nticorps anti-**E**GFR des patients porteurs d'un cancer **C**olorectal **M**étastatique), auquel participe l'ensemble des plateformes INCa de génétique des tumeurs va nous permettre de comparer cette méthode à d'autres méthodes alternatives, tels que le séquençage direct, la PCR en temps réel (Taqman), le SNaPshot, le pyroséquençage et la méthode HRM suivie du séquençage ou de la PCR en temps réel.

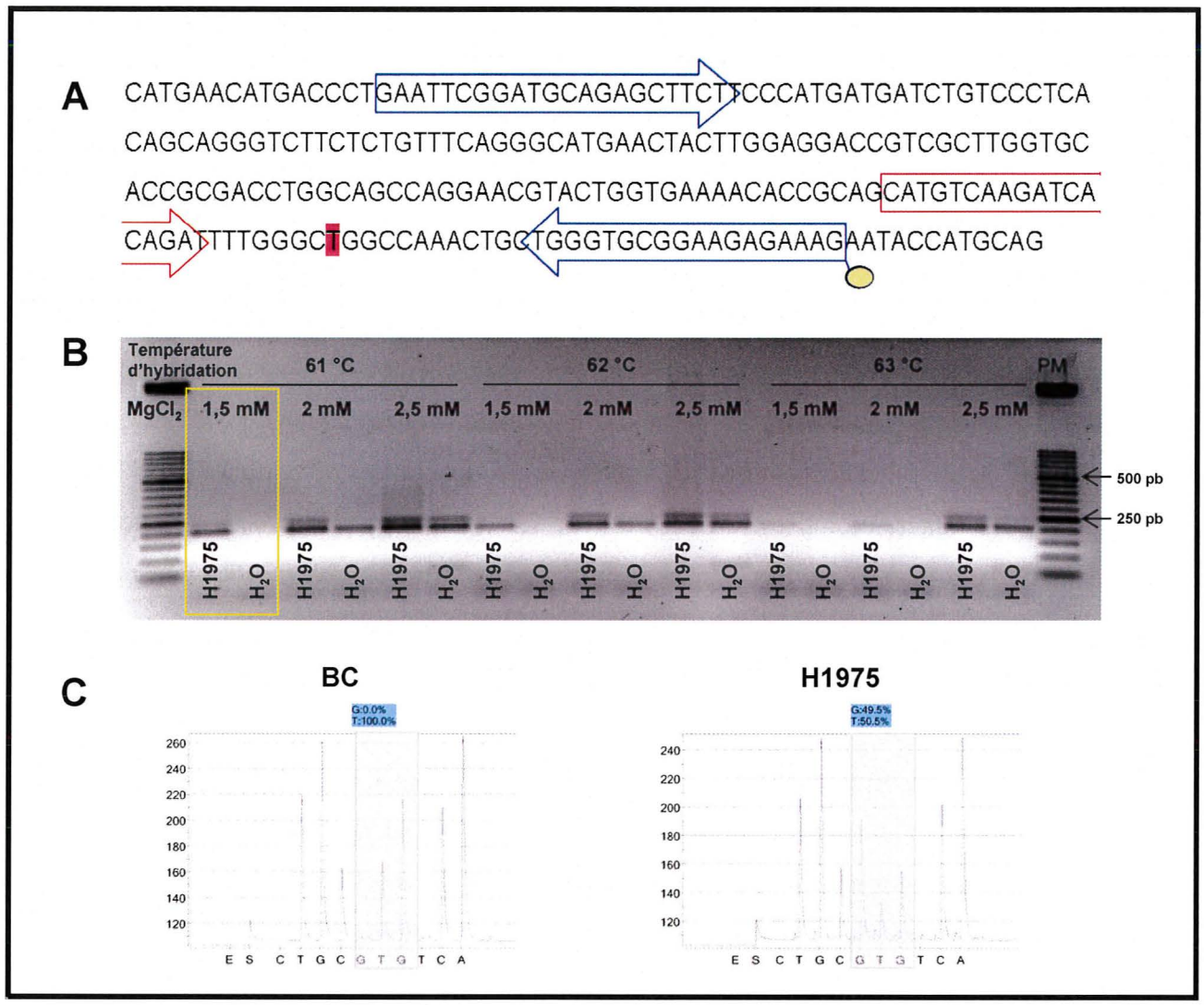


Figure 19. Analyse de la mutation c.2573T>G ; p.Leu858Arg (L588R) de l'exon 21 de l'*EGFR* par pyroséquençage.

A : Choix des amorces PCR (flèches bleues) et de séquence (flèche rouge). La position de la mutation est en rouge. ⬭ : biotine.

B : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des différentes conditions de PCR testées et sélection (cadre jaune) des conditions optimales.

C : Exemples de pyrogrammes obtenus après amplification de l'ADN extrait à partir de Buffy Coat (BC) ou de la lignée H1975.

4 . Recherche des mutations du gène *EGFR*

4.1 . Mutation L858R de l'exon 21

Les amorces PCR définies pour l'amplification de l'exon 21 permettent l'obtention d'un fragment de 195 pb. Après optimisation, les conditions d'amplification sont les suivantes : dénaturation initiale à 95°C pendant 10 minutes, 45 cycles (20 s à 95°C, 20 s à 61°C, 20 s à 72°C), élongation finale à 72°C pendant 10 minutes. La concentration de $MgCl_2$ utilisée est de 1,5 mM. Pour l'analyse au pyroséquenceur, l'ordre de dispensation des nucléotides est CTGCGTGTCA (figure 19).

Nous avons ensuite déterminé la sensibilité de la méthode à l'aide de la lignée H1975 qui est mutée (c.2573T>G ; p.Leu858Arg (L858R)). L'ADN de cette lignée a été dilué avec l'ADN extrait de buffy coat (sauvage), dans différentes proportions (100 %, 80 %, 60 %, 40 %, 20 %, 10 %, 5 % et 0 %) (tableau XI). La limite de détection de cette technique est de l'ordre de 10 % d'ADN muté.

Tableau XI . Sensibilité du pyroséquençage pour détecter la mutation L858R de l'exon 21 de l'*EGFR*.

Proportion ADN muté/ ADN sauvage	100 / 0*	80 / 20	60 / 40	40 / 60	20 / 80	10 / 90	5 / 95	0 / 100
H1975 Exon 21	42 ± 2,1%	25,8	14,4	6	1	0	0	0

* : ces résultats correspondent à trois analyses indépendantes du même échantillon.

Nous avons comparé les résultats obtenus par séquençage direct et pyroséquençage sur 51 échantillons congelés (n = 17) ou fixés et inclus en paraffine (n = 34). La concordance des résultats est de 98 % (50 échantillons sur 51) (tableau XII).

Tableau XII . Statut de l'exon 21 de l'*EGFR* (sauvage ou muté) déterminé par séquençage direct et par pyroséquençage

Séquençage / Pyroséquençage	Sauvage	Muté
Sauvage	43	0
Muté	1	7

Seule une mutation L858R, d'un échantillon inclus en paraffine, a été uniquement détectée par pyroséquençage.

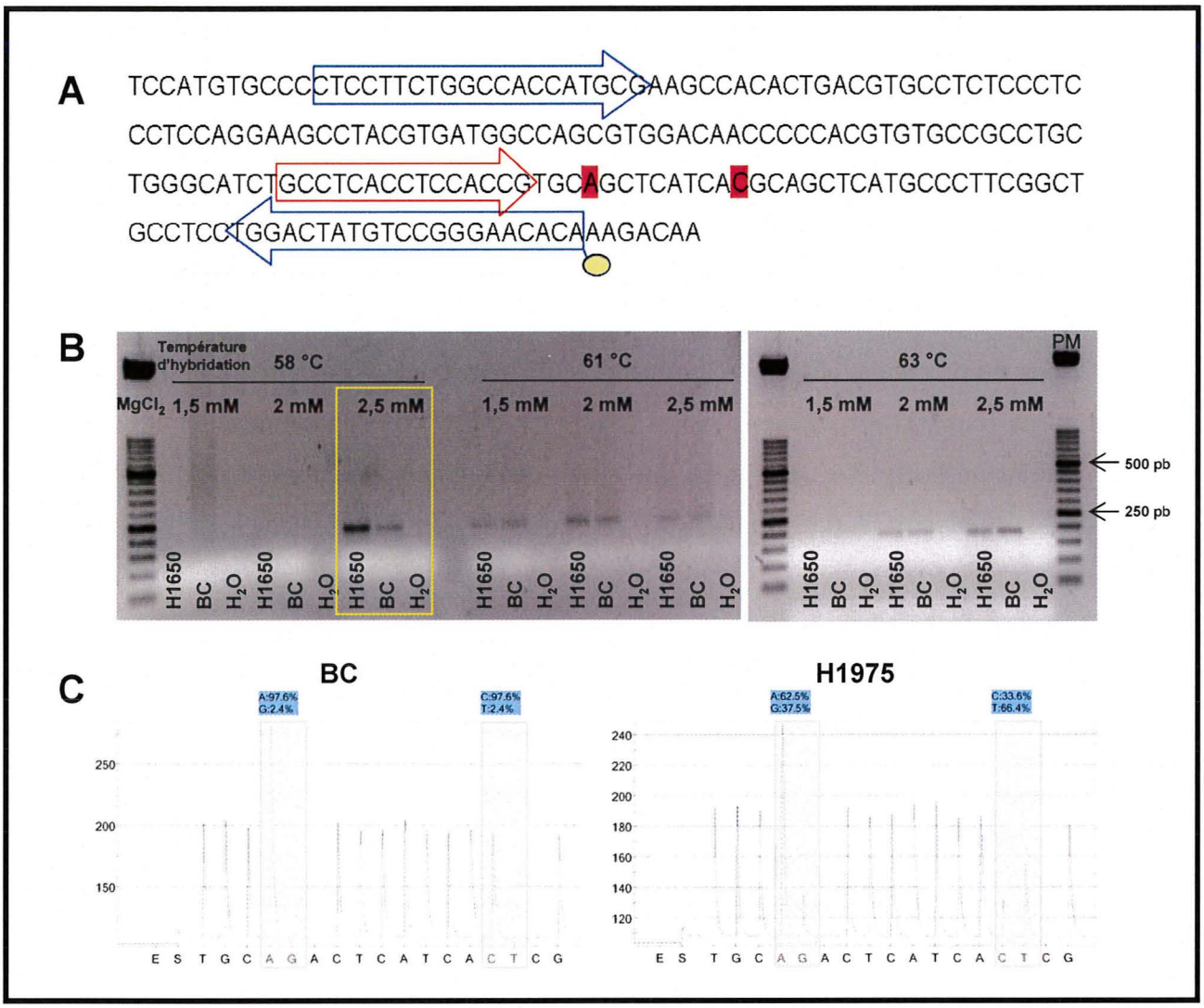


Figure 20. Analyse de la mutation de résistance c.2369C>T ; p.Thr790Met (T790M) et du polymorphisme c.2361G>A ; p.Gln787Gln de l'exon 20 de l'*EGFR* par pyroséquençage.

A : Choix des amorces PCR (flèches bleues) et de séquence (flèche rouge). La position de la mutation est en rouge. ● : biotine.

B : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des différentes conditions de PCR testées et sélection (cadre jaune) des conditions optimales.

C : Exemples de pyrogrammes obtenus après amplification de l'ADN extrait à partir de Buffy Coat (BC) ou de la lignée H1975.

4.2. Mutation de résistance T790M de l'exon 20

Pour l'exon 20, les amorces PCR sélectionnées permettent l'obtention d'un fragment de 185 pb. Après optimisation, les conditions d'amplification sont les suivantes : dénaturation initiale à 95°C pendant 10 minutes, 45 cycles (20 s à 95°C, 20 s à 58°C, 20 s à 72°C), élongation finale à 72°C pendant 10 minutes. La concentration de $MgCl_2$ utilisée est de 2,5 mM. L'analyse des fragments est réalisée avec l'ordre de dispensation des nucléotides suivant : TGCAGACTCATCACTG (figure 20).

La sensibilité de la méthode a également été déterminée avec l'ADN de la lignée H1975 qui possède la mutation de résistance T790M (c.2369C>T ; p.Thr790Met). De la même manière que pour l'exon 21, l'ADN de cette lignée a été dilué avec l'ADN extrait de buffy coat, dans différentes proportions (100 %, 80 %, 60 %, 40 %, 20 %, 10 %, 5 % et 0 %) (tableau XIII). La limite de détection de cette technique est de l'ordre de 5 % d'ADN muté.

Tableau XIII. Sensibilité du pyroséquençage pour détecter la mutation T790M de l'exon 20 de l'*EGFR*.

Proportion ADN muté/ ADN sauvage	100 / 0*	80 / 20	60 / 40	40 / 60	20 / 80	10 / 90	5 / 95	0 / 100
H1975 Exon 20	65,3 ± 2.1 %	45,5	29,4	17,7	11,4	5,3	0	0

* : ces résultats correspondent à trois analyses indépendantes du même échantillon.

Parmi les 17 échantillons analysés par séquençage direct et par pyroséquençage, 10 étaient congelés et 7 étaient fixés et inclus en paraffine. Le statut de l'exon 20 est sauvage pour tous les échantillons, quelque soit la méthode utilisée.

L'analyse de l'exon 20 par pyroséquençage permet également de mettre en évidence un polymorphisme (c.2361G>A ; p.Gln787Gln). Celui-ci n'a pas de valeur prédictive de réponse et il est détecté dans la majorité des échantillons.

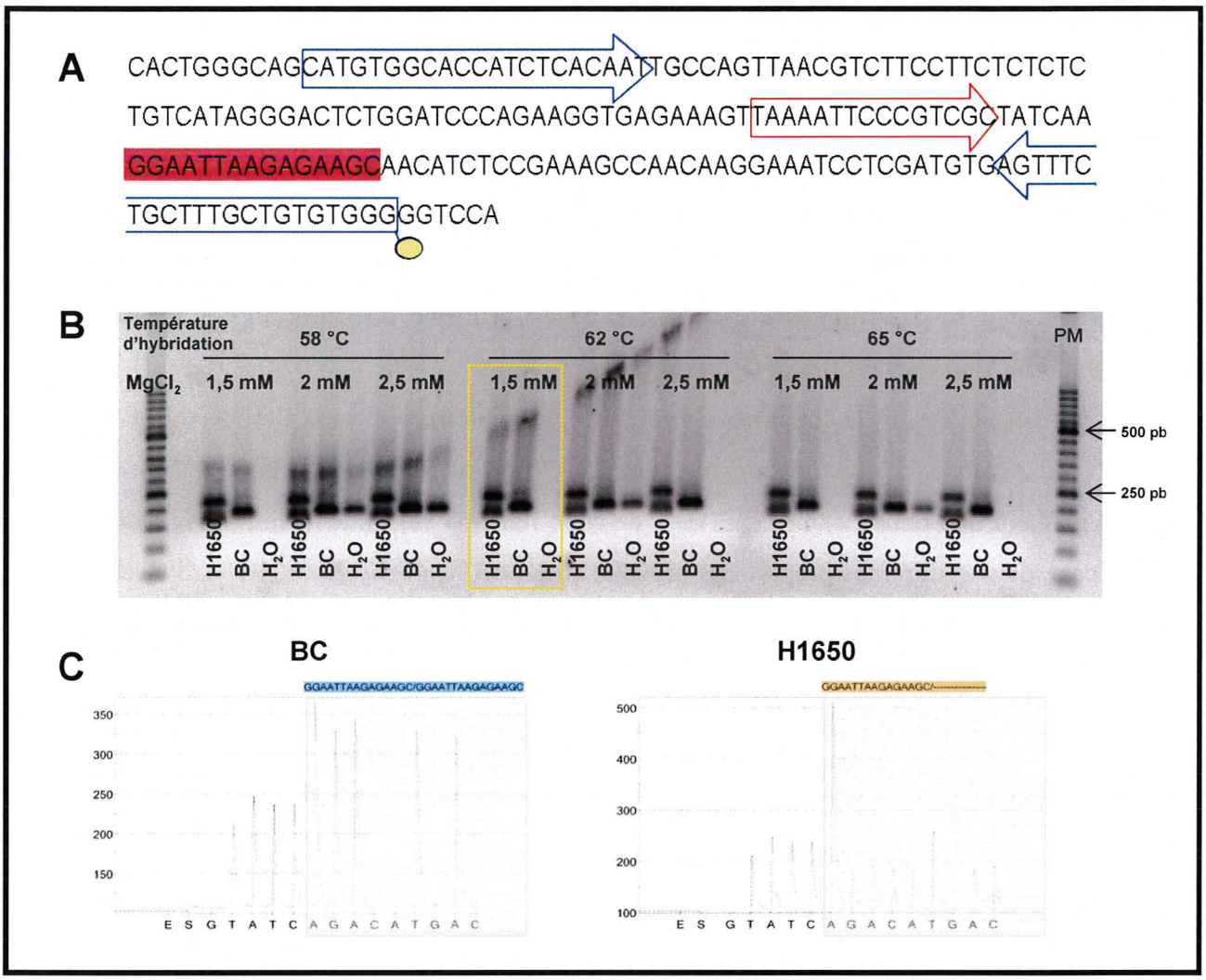


Figure 21. Analyse de la délétion LREA de l'exon 19 de l'*EGFR* par pyroséquençage.
A : Choix des amorces PCR (flèches bleues) et de séquence (flèche rouge). La position de la mutation est en rouge. ⬭ : biotine.
B : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des différentes conditions de PCR testées et sélection (cadre jaune) des conditions optimales.
C : Exemples de pyrogrammes obtenus après amplification de l'ADN extrait à partir de Buffy Coat (BC) ou de la lignée H1650 (c.2235_2249del ; p.Glu746_Ala750del).

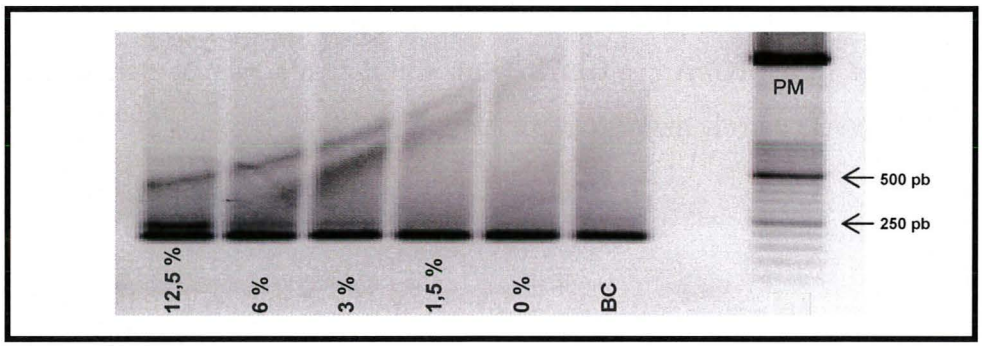


Figure 22. Analyse des produits PCR de l'exon 19 sur gel d'agarose.
Des mélanges ADN muté/ADN sauvage contenant différents pourcentages d'ADN muté de la lignée H1650 ont été amplifié pour l'exon 19

4.3 . Délétion LREA de l'exon 19

Les amorces PCR définies pour l'amplification de l'exon 19 permettent l'obtention d'un fragment de 180 pb. Après optimisation, les conditions d'amplification sont les suivantes : dénaturation initiale à 95°C pendant 10 minutes, 45 cycles (20 s à 95°C, 20 s à 62°C, 20 s à 72°C), élongation finale à 72°C pendant 10 minutes. La concentration de $MgCl_2$ utilisée est de 1,5 mM. L'ordre de dispensation des nucléotides pour l'analyse de fragment est GTATCAGACATGAC (figure 21).

La lignée H1650, qui présente la délétion c.2235_2249del ; p.Glu746_Ala750del (LREA) de l'exon 19, a été utilisée pour la mise au point. Lorsqu'un échantillon présente une délétion, une double bande est détectée lors de l'analyse des produits PCR sur gel d'agarose. Une seule bande est présente pour les échantillons sauvages. Ainsi, les tests réalisés avec différentes dilutions de l'ADN de la lignée H1650 mélangé avec de l'ADN extrait de buffy coat, montrent que cette double bande n'est quasiment plus détectable pour le mélange contenant 6 % d'ADN délété (Figure 22). Les délétions de l'exon 19 sont toutes centrées sur le motif LREA, mais elles ne possèdent pas toutes les mêmes bornes. Ainsi, l'identification précise de la délétion n'est pas possible par pyroséquençage. Cette analyse permet uniquement de confirmer ou d'infirmer le statut sauvage de l'exon 19.

Nous avons ensuite comparé les résultats obtenus par séquençage direct et pyroséquençage sur 16 échantillons congelés (n=3) ou fixés et inclus en paraffine (n=13). La concordance des résultats est de 87,5 % (14 échantillons sur 16) (tableau XIV). Le pyroséquençage permet cependant de mettre en évidence des délétions pour deux échantillons (inclus en paraffine) identifiés comme sauvage par séquençage direct.

Tableau XIV . Statut de l'exon 19 de l'*EGFR* (sauvage ou muté) déterminé par séquençage direct et par pyroséquençage

Séquençage / Pyroséquençage	Sauvage	Muté
Sauvage	4	0
Muté	2	10

5 . Discussion de l'analyse de mutations de l'EGFR par pyroséquençage

L'utilisation du pyroséquençage est intéressante pour l'analyse des exons 20 et 21 et permet la détection des mutations avec une meilleure sensibilité (5 à 10 %) que le séquençage direct.

Les conditions déterminées pour analyser l'exon 19 permettent de détecter les allèles délétés sur gel d'agarose avec une sensibilité de 6 %. En effet, Sugio et coll. (2006) ont déjà décrit que la double bande, détectée lors de l'analyse sur gel d'agarose ou de polyacrylamide des produits PCR de l'exon 19, est caractéristique des échantillons délétés. L'analyse par pyroséquençage est utilisée pour confirmer le statut sauvage, mais ne permet pas de caractériser précisément une délétion. L'identification de celle-ci doit être réalisée par séquençage direct.

De la même manière que pour *KRAS*, les résultats obtenus par séquençage direct et par pyroséquençage sont comparables, mais certaines mutations de l'*EGFR* sont détectées uniquement par pyroséquençage. Ces différences observées sont directement liées à la différence de sensibilité des deux méthodes.

Pour l'exon 18, l'amplification PCR a été mise au point, mais nous ne possédons pas de lignée cellulaire ou d'échantillons présentant de mutations de l'exon 18, qui permettraient de déterminer la sensibilité de cette méthode.

D'autres méthodes (technique HRM, d-HPLC, ...) d'analyse des mutations de *KRAS* et de l'*EGFR* ont été décrites. Comme le pyroséquençage, elles sont plus rapides, moins coûteuses et plus sensibles que le séquençage direct. Certaines nécessitent un équipement particulier ou sont des méthodes de criblage qui doivent être couplées à une méthode d'identification des mutations. A l'heure actuelle, aucune recommandation n'existe pour leur utilisation en clinique, mais des études nationales sont mises en œuvre pour les évaluer et les comparer.

CONCLUSIONS

MÉMOIRE SOUTENU PAR : Sandrine DUFORT

TITRE : Marqueurs moléculaires et thérapies ciblées : exemple des mutations de l'*EGFR* et de *KRAS* comme marqueurs prédictifs de réponse aux agents ciblant l'EGFR

CONCLUSIONS

Les cancers broncho-pulmonaires (CBNPC) et colorectaux sont les deux premières causes de mortalité par cancer dans le monde. Détectés tardivement, ils sont de très mauvais pronostic, avec une survie à 5 ans respectivement de 12 % et 5 %. Récemment, de nouvelles thérapies dites ciblées, comme par exemple les anticorps monoclonaux anti-EGFR ou les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase (TKI) de l'EGFR, ont été développées. Une faible proportion des patients porteurs d'un cancer broncho-pulmonaire ou colorectal répond à ces traitements ; leur survie est augmentée et leur qualité de vie améliorée. Différentes études ont permis de préciser les facteurs prédictifs de réponse, tels que les mutations des exons 18 à 21 de l'*EGFR* et celles de l'exon 1 de *KRAS*. Ainsi, les anticorps monoclonaux sont indiqués dans le traitement du cancer colorectal métastatique lorsque *KRAS* est sauvage. Pour le traitement des CBNPC par TKIs, le statut mutationnel de l'*EGFR* est en cours d'évaluation

Au laboratoire, nous avons mis en place ces nouvelles analyses. Dans un premier temps, la recherche des mutations a été réalisée par séquençage direct. Mais cette méthode est coûteuse, longue et peu sensible (limite de détection de 20 à 25 %). Nous avons donc développé une méthode alternative : le pyroséquençage. Cette méthode permet d'analyser les mutations des codons 12 et 13 de l'exon 1 de *KRAS*, les mutations/délétions les plus fréquentes de l'*EGFR* (mutation L858R de l'exon 21 et délétion LREA de l'exon 19), ainsi que la mutation de résistance T790M de l'exon 20. Applicables à tous les types de prélèvements (congelés, fixés et inclus en paraffine), cette technique est rapide et sensible (limite de détection de 5 à 10 %).

Différentes méthodes, de sensibilité similaire au pyroséquençage, sont également décrites pour la recherche des mutations de *KRAS* et de l'*EGFR*. Toutefois, il n'existe aucune recommandation concernant la technique à utiliser en routine. Au niveau national, différentes

études ont été mises en place pour comparer et valider les méthodes qui sont le plus robustes pour une utilisation en clinique et assurer une prise en charge optimale des malades.

Le statut de *KRAS* est ainsi le premier marqueur moléculaire utilisé comme marqueur prédictif de réponse aux thérapies ciblées. Le développement de nouvelles molécules et l'évaluation de nouveaux marqueurs laissent à penser qu'il ne sera pas le dernier. Ainsi, par exemple, les mutations de *BRAF*, gène impliqué dans la cascade de signalisation de l'EGFR, semblent également prédictives de la réponse aux antagonistes de l'EGFR, et la méthylation du gène *MGMT* cible les patients porteurs d'un gliome susceptibles de répondre au temozolomide (Temadol®).

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le 20 mars 2009.

LE DOYEN
Pr Renée Grillot

LE PRESIDENT DE JURY
Pr Patrice Faure

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
U.F.R.
DE
PHARMACIE
GRENOBLE 1

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Ahmadian A, Ehn M, Hober S (2006) Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chim Acta* 363: 83-94

Akerley WL (2006) Erlotinib as first-time treatment for untreated advance stage NSCLC with good prognosis. *J Clin Oncol* 24 : 408 (abstract 7178)

Alberg AJ, Brock MV, Samet JM (2005) Epidemiology of lung cancer: looking to the future. *J Clin Oncol* 23: 3175-3185

Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26: 1626-1634

Arteaga CL (2001) The epidermal growth factor receptor: from mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia. *J Clin Oncol* 19: 32S-40S

Asano H, Toyooka S, Tokumo M, Ichimura K, Aoe K, Ito S, Tsukuda K, Ouchida M, Aoe M, Katayama H, Hiraki A, Sugi K, Kiura K, Date H, Shimizu N (2006) Detection of EGFR gene mutation in lung cancer by mutant-enriched polymerase chain reaction assay. *Clin Cancer Res* 12: 43-48

B

Baselga J (2001) Targeting the epidermal growth factor receptor: a clinical reality. *J Clin Oncol* 19: 41S-44S

Beasley MB, Brambilla E, Travis WD (2005) The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol* 40: 90-97

Bell DW, Lynch TJ, Haserlat SM, Harris PL, Okimoto RA, Brannigan BW, Sgroi DC, Muir B, Riemenschneider MJ, Iacona RB, Krebs AD, Johnson DH, Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, Fukuoka M, Kris MG, Baselga J, Ochs JS, Haber DA (2005) 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* 23: 8081-8092

Benhamiche-Bouvier AM, Clinard F, Phelip JM, Rassiat E, Faivre J (2000) Colorectal cancer prevalence in France. *Eur J Cancer Prev* 9: 303-307

Blanchon F, Grivaux M, Collon T, Zureik M, Barbieux H, Benichou-Flurin M, Breton JL, Coetmeur D, Delclaux B, Asselain B, Piquet J (2002) [Epidemiologic of primary bronchial carcinoma management in the general French hospital centers]. *Rev Mal Respir* 19: 727-734

Boffetta P (2004) Epidemiology of environmental and occupational cancer. *Oncogene* 23: 6392-6403

Bonner JA, Raisch KP, Trummell HQ, Robert F, Meredith RF, Spencer SA, Buchsbaum DJ, Saleh MN, Stackhouse MA, LoBuglio AF, Peters GE, Carroll WR, Waksal HW (2000) Enhanced apoptosis with combination C225/radiation treatment serves as the impetus for clinical investigation in head and neck cancers. *J Clin Oncol* 18: 47S-53S

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK (2006) Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354: 567-578

Bos JL (1989) ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49: 4682-4689

Boutron-Ruault MC, Senesse P, Meance S, Belghiti C, Faivre J (2001) Energy intake, body mass index, physical activity, and the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Nutr Cancer* 39: 50-57

Boutron MC, Faivre J, Dop MC, Quipourt V, Senesse P (1995) Tobacco, alcohol, and colorectal tumors: a multistep process. *Am J Epidemiol* 141: 1038-1046

Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y (2001) The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 18: 1059-1068

Brink M, de Goeij AF, Weijenberg MP, Roemen GM, Lentjes MH, Pachen MM, Smits KM, de Bruine AP, Goldbohm RA, van den Brandt PA (2003) K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* 24: 703-710

Butts CA, Bodkin D, Middleman EL, Englund CW, Ellison D, Alam Y, Kreisman H, Graze P, Maher J, Ross HJ, Ellis PM, McNulty W, Kaplan E, Pautret V, Weber MR, Shepherd FA (2007) Randomized phase II study of gemcitabine plus cisplatin or carboplatin [corrected], with or without cetuximab, as first-line therapy for patients with advanced or metastatic non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 25: 5777-5784

C

Carter P (2001) Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 1: 118-129

Chin TM, Anuar D, Soo R, Salto-Tellez M, Li WQ, Ahmad B, Lee SC, Goh BC, Kawakami K, Segal A, Iacopetta B, Soong R (2007) Detection of epidermal growth factor receptor variations by partially denaturing HPLC. *Clin Chem* 53: 62-70

Ciardiello F, Bianco R, Damiano V, De Lorenzo S, Pepe S, De Placido S, Fan Z, Mendelsohn J, Bianco AR, Tortora G (1999) Antitumor activity of sequential treatment with topotecan and anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225. *Clin Cancer Res* 5: 909-916

Ciardiello F, Tortora G (2001) A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 7: 2958-2970

Citri A, Skaria KB, Yarden Y (2003) The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 284: 54-65

Clayton SJ, Scott FM, Walker J, Callaghan K, Haque K, Liloglou T, Xinarianos G, Shawcross S, Ceuppens P, Field JK, Fox JC (2000) K-ras point mutation detection in lung cancer: comparison of two approaches to somatic mutation detection using ARMS allele-specific amplification. *Clin Chem* 46: 1929-1938

Clinicaltrials.gov, website de l'US National Institute of Health relative aux essais cliniques, dernière consultation le 20.10.2009.

Cohen V, Agulnik JS, Jarry J, Batist G, Small D, Kreisman H, Tejada NA, Miller WH, Jr., Chong G (2006) Evaluation of denaturing high-performance liquid chromatography as a rapid detection method for identification of epidermal growth factor receptor mutations in nonsmall-cell lung cancer. *Cancer* 107: 2858-2865

Crawford J, Sandler AB, Hammond LA, Schiller J, Belani C, Kozloff M, et al. (2004) ABX-EGF in combination with paclitaxel and carboplatine for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 22: 14s. abstract

Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351: 337-345

D

Dautzenburg B and Choukroun G (1998) Cancers bronchopulmonaires primitives non à petites cellules et tumeurs à malignité réduite. EMC-pneumologie 6-002-H-20 : 16p.

De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, Biesmans B, Van Laethem JL, Peeters M, Humblet Y, Van Cutsem E, Tejpar S (2008) KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol* 19: 508-515

Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP, Bastit L, Killian A, Sesboue R, Tuech JJ, Queuniet AM, Paillot B, Sabourin JC, Michot F, Michel P, Frebourg T (2007) Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer* 96: 1166-1169

Do H, Krypuy M, Mitchell PL, Fox SB, Dobrovic A (2008) High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. *BMC Cancer* 8: 142

E

Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, Goddard AD, Heldens SL, Herbst RS, Ince WL, Janne PA, Januario T, Johnson DH, Klein P, Miller VA, Ostland MA, Ramies DA, Sebisanovic D, Stinson JA, Zhang YR, Seshagiri S, Hillan KJ (2005) 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* 23: 5900-5909

Eberhard DA, Giaccone G, Johnson BE (2008) Biomarkers of response to epidermal growth factor receptor inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group: standardization for use in the clinical trial setting. *J Clin Oncol* 26: 983-994

Eilstein D, Uhry Z, Lim TA, Bloch J (2008) Lung cancer mortality in France. Trend analysis and projection between 1975 and 2012, using a Bayesian age-period-cohort model. *Lung Cancer* 59: 282-290

Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP (1992) Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 4309-4313

Endo K, Konishi A, Sasaki H, Takada M, Tanaka H, Okumura M, Kawahara M, Sugiura H, Kuwabara Y, Fukai I, Matsumura A, Yano M, Kobayashi Y, Mizuno K, Haneda H, Suzuki E, Iuchi K, Fujii Y (2005) Epidermal growth factor receptor gene mutation in non-small cell lung cancer using highly sensitive and fast TaqMan PCR assay. *Lung Cancer* 50: 375-384

Eng C, Maurel J, Scheithauer W, et al. (2007) Impact of quality of life of adding cetuximab to irinotécan in patients who have failed prior oxaliplatine-based therapy : the EPIC trial. *J Clin Oncol* 25: Suppl:164s. abstract

F

Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P (2007) Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 18: 581-592

Fischer GA, Kuo T, Cho CD, et al. (2004) A phase II study of gefitinib in combination with FOLFOX4 in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 22: 197 abstract

Folprecht G, Lutz MP, Schoffski P, Seufferlein T, Nolting A, Pollert P, Kohne CH (2006) Cetuximab and irinotecan/5-fluorouracil/folinic acid is a safe combination for the first-line treatment of patients with epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal carcinoma. *Ann Oncol* 17: 450-456

Forbes S, Clements J, Dawson E, Bamford S, Webb T, Dogan A, Flanagan A, Teague J Wooster R, Futreal PA, Stratton MR (2006) COSMIC 2005. *British J Cancer* 94 : 318-322

Friday BB, Adjei AA (2005) K-ras as a target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 1756: 127-144

Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY, Nishiwaki Y, Vansteenkiste J, Kudoh S, Rischin D, Eek R, Horai T, Noda K, Takata I, Smit E, Averbuch S, Macleod A, Feyereislova A, Dong RP, Baselga J (2003) Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol* 21: 2237-2246

G

Gazdar AF, Shigematsu H, Herz J, Minna JD (2004) Mutations and addiction to EGFR: the Achilles 'heal' of lung cancers? *Trends Mol Med* 10: 481-486

Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Miller V, Natale RB, Schiller JH, von Pawel J, Pluzanska A, Gatzemeier U, Grous J, Ochs JS, Averbuch SD, Wolf MK, Rennie P, Fandi A, Johnson DH (2004) Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. *J Clin Oncol* 22: 777-784

Giaccone G, Gallegos RM, Le Chevalier T, Thatcher N, Smit E, Rodriguez JA, Janne P, Oulid-Aissa D, Soria JC (2006) Erlotinib for frontline treatment of advanced non-small cell lung cancer: a phase II study. *Clin Cancer Res* 12: 6049-6055

Gilbert MT, Haselkorn T, Bunce M, Sanchez JJ, Lucas SB, Jewell LD, Van Marck E, Worobey M (2007) The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *PLoS ONE* 2: e537

Goldstein NS, Armin M (2001) Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer* 92: 1331-1346

Goncalves A, Esteyries S, Taylor-Smedra B, Lagarde A, Ayadi M, Monges G, Bertucci F, Esterni B, Delpero JR, Turrini O, Lelong B, Viens P, Borg JP, Birnbaum D, Olschwang S, Viret F (2008) A polymorphism of EGFR extracellular domain is associated with progression free-survival in metastatic colorectal cancer patients receiving cetuximab-based treatment. *BMC Cancer* 8: 169

Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A (2004) The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4: 361-370

H

Han SW, Kim TY, Jeon YK, Hwang PG, Im SA, Lee KH, Kim JH, Kim DW, Heo DS, Kim NK, Chung DH, Bang YJ (2006) 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* 12: 2538-2544

Hanna N, Lilenbaum R, Ansari R, Lynch T, Govindan R, Janne PA, Bonomi P (2006) Phase II trial of cetuximab in patients with previously treated non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 24: 5253-5258

Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, Natale RB, Miller V, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Oliff I, Reeves JA, Wolf MK, Krebs AD, Averbuch SD, Ochs JS, Grous J, Fandi A, Johnson DH (2004) Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. *J Clin Oncol* 22: 785-794

Hilbe W, Dlaska M, Duba HC, Dirnhofer S, Eisterer W, Oberwasserlechner F, Mildner A, Schmid T, Kuhr T, Woll E (2003) Automated real-time PCR to determine K-ras codon 12 mutations in non-small cell lung cancer: comparison with immunohistochemistry and clinico-pathological features. *Int J Oncol* 23: 1121-1126

Hill C, Doyon F (2006) [The frequency of cancer in France in year 2002, and trends since 1968]. *Bull Cancer* 93: 7-11

Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM, Baron AE, Zeng C, Franklin WA (2003) Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* 21: 3798-3807

Holbro T, Civenni G, Hynes NE (2003) The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 284: 99-110

Holbro T, Hynes NE (2004) ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 195-217

Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, Boffetta P, Hashibe M, Zaridze D, Mukeria A, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Bencko V, Foretova L, Janout V, Chen C, Goodman G, Field JK, Liloglou T, Xinarianos G, Cassidy A, McLaughlin J, Liu G, Narod S, Krokan HE, Skorpen F, Elvestad MB, Hveem K, Vatten L, Linseisen J, Clavel-Chapelon F, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB, Lund E, Martinez C, Bingham S, Rasmuson T, Hainaut P, Riboli E, Ahrens W, Benhamou S, Lagiou P, Trichopoulos D, Holcatova I, Merletti F, Kjaerheim K, Agudo A, Macfarlane G, Talamini R, Simonato L, Lowry R, Conway DI, Znaor A, Healy C, Zelenika D, Boland A, Delepine M, Foglio M, Lechner D, Matsuda F, Blanche H, Gut I, Heath S, Lathrop M, Brennan P (2008) A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature* 452: 633-637

Hynes NE, Lane HA (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5: 341-354

I

Irmer D, Funk JO, Blaukat A (2007) EGFR kinase domain mutations - functional impact and relevance for lung cancer therapy. *Oncogene* 26: 5693-5701

Itabashi T, Maesawa C, Uchiyama M, Higuchi T, Masuda T (2004) Quantitative detection of mutant alleles of the K-ras gene with minor groove binder-conjugated fluorogenic DNA probes. *Int J Oncol* 24: 687-696

J

Janne PA, Borras AM, Kuang Y, Rogers AM, Joshi VA, Liyanage H, Lindeman N, Lee JC, Halmos B, Maher EA, Distel RJ, Meyerson M, Johnson BE (2006) A rapid and sensitive enzymatic method for epidermal growth factor receptor mutation screening. *Clin Cancer Res* 12: 751-758

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ (2008) Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 58: 71-96

K

Karnes WE, Jr., Weller SG, Adjei PN, Kottke TJ, Glenn KS, Gores GJ, Kaufmann SH (1998) Inhibition of epidermal growth factor receptor kinase induces protease-dependent apoptosis in human colon cancer cells. *Gastroenterology* 114: 930-939

Kimura H, Kasahara K, Kawaishi M, Kunitoh H, Tamura T, Holloway B, Nishio K (2006) Detection of epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 12: 3915-3921

Kochupurakkal BS, Harari D, Di Segni A, Maik-Rachline G, Lyass L, Gur G, Kerber G, Citri A, Lavi S, Eilam R, Chalifa-Caspi V, Eshhar Z, Pikarsky E, Pinkas-Kramarski R, Bacus SS, Yarden Y (2005) Epigen, the last ligand of ErbB receptors, reveals intricate relationships between affinity and mitogenicity. *J Biol Chem* 280: 8503-8512

Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Yoshida K, Hida T, Tsuboi M, Tada H, Kuwano H, Mitsudomi T (2006) Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib. *Clin Cancer Res* 12: 5764-5769

Kranenburg O (2005) The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochim Biophys Acta* 1756: 81-82

Krause DS, Van Etten RA (2005) Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 353: 172-187

Kris MG, Natale RB, Herbst RS, Lynch TJ, Jr., Prager D, Belani CP, Schiller JH, Kelly K, Spiridonidis H, Sandler A, Albain KS, Cella D, Wolf MK, Averbuch SD, Ochs JJ, Kay AC (2003) Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA* 290: 2149-2158

Krypuy M, Newnham GM, Thomas DM, Conron M, Dobrovic A (2006) High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 6: 295

L

Lababede O, Meziane MA, Rice TW (1999) TNM staging of lung cancer: a quick reference chart. *Chest* 115: 233-235

Lamoril J, Ameziane N, Deybach J-C, Bouizegarène P, Bogard M (2008) DNA sequencing technologies: A revolution in motion. Part one. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* 23: 260-279

Le Faou AL, Scemama O (2005) [Epidemiology of tobacco smoking]. *Rev Mal Respir* 22: 8S27-8S32

Lee JW, Soung YH, Kim SY, Park WS, Nam SW, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH (2005) Absence of EGFR mutation in the kinase domain in common human cancers besides non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 113: 510-511

Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Cote JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P (2006) KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 66: 3992-3995

Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouche O, Landi B, Louvet C, Andre T, Bibeau F, Diebold MD, Rougier P, Ducreux M, Tomasic G, Emile JF, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P (2008) KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 26: 374-379

Lilenbaum RC (2006a) The evolving role of cetuximab in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 12: 4432s-4435s

Lilenbaum R, Axerold R, Thomas S, Dowlati A, Seigel L, Albert D, et al. (2006b) Randomized phase II trial of single agent erlotinib vs. standard chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) and performance status (PS) of 2. *J Clin Oncol* 24: Suppl:369 abstract

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350: 2129-2139

Lynch T, Patel T, Dreisbach L, et al. (2007) A randomized multicenter phase III study of cetuximab (Erbitux®) in combination with Taxane/Carboplatin vs Taxane/Carboplatin alone first-line treatment for patients with advanced/metastatic Non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Thor Oncol* 12th World Conference on Lung Cancer, Seoul, Korea, September 2-6. 2 (8) Suppl. 4: S340-S341

M

Mackenzie MJ, Hirte HW, Glenwood G, Jean M, Goel R, Major PP, Miller WH, Jr., Panasci L, Lorimer IA, Batist G, Matthews S, Douglas L, Seymour L (2005) A phase II trial of ZD1839 (Iressa) 750 mg per day, an oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, in patients with metastatic colorectal cancer. *Invest New Drugs* 23: 165-170

Marchetti A, Martella C, Felicioni L, Barassi F, Salvatore S, Chella A, Camplese PP, Iarussi T, Mucilli F, Mezzetti A, Cuccurullo F, Sacco R, Buttitta F (2005) EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol* 23: 857-865

Maxam AM, Gilbert W (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 560-564

Melamede RJ (1985) US Patent 4863849

Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z, Derynck R (1995) Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 376: 337-341

Miller WE, Earp HS, Raab-Traub N (1995) The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor. *J Virol* 69: 4390-4398

Modi S, Seidman AD (2002) An update on epidermal growth factor receptor inhibitors. *Curr Oncol Rep* 4: 47-55

Morinaga R, Okamoto I, Fujita Y, Arao T, Sekijima M, Nishio K, Ito H, Fukuoka M, Kadota J, Nakagawa K (2008) Association of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations with EGFR amplification in advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 99: 2455-2460

Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Gambacorta M, Siena S, Bardelli A (2005) Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol* 6: 279-286

Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, Ramirez G, Gunn G, Zoltick PW, Biegel JA, Hayes RL, Wong AJ (1995) Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* 55: 5536-5539

Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Emlet DR, Montgomery RB, Wong AJ (1998) Constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a naturally occurring mutant epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 273: 200-206

N

Nagahara H, Mimori K, Ohta M, Utsunomiya T, Inoue H, Barnard GF, Ohira M, Hirakawa K, Mori M (2005) Somatic mutations of epidermal growth factor receptor in colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 11: 1368-1371

Nicholson RI, Gee JM, Harper ME (2001) EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4: S9-15

Noonberg SB, Benz CC (2000) Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily: role as anticancer agents. *Drugs* 59: 753-767

O

Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Yan L, Cantor M, Namgyal C, Mino-Kenudson M, Lauwers GY, Loda M, Fuchs CS (2005) Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. *J Mol Diagn* 7: 413-421

Oliveira C, Westra JL, Arango D, Ollikainen M, Domingo E, Ferreira A, Velho S, Niessen R, Lagerstedt K, Alhopuro P, Laiho P, Veiga I, Teixeira MR, Ligtenberg M, Kleibeuker JH, Sijmons RH, Plukker JT, Imai K, Lage P, Hamelin R, Albuquerque C, Schwartz S Jr, Lindblom A, Peltomaki P, Yamamoto H, Aaltonen LA, Seruca R, Hofstra RM (2004) Distinct patterns of KRAS mutations in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status. *Hum Mol Genet* 13: 2303-2311

Overholser JP, Prewett MC, Hooper AT, Waksal HW, Hicklin DJ (2000) Epidermal growth factor receptor blockade by antibody IMC-C225 inhibits growth of a human pancreatic carcinoma xenograft in nude mice. *Cancer* 89: 74-82

P

Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M (2004) EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304: 1497-1500

Pan Q, Pao W, Ladanyi M (2005) Rapid polymerase chain reaction-based detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in lung adenocarcinomas. *J Mol Diagn* 7: 396-403

Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H (2004) 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* 101: 13306-13311

Pao W, Miller VA (2005) Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J Clin Oncol* 23: 2556-2568

Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, Kris MG, Varmus H (2005) Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2: e73

Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, Zakowski MF, Heelan RT, Kris MG, Varmus HE (2005a) KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med* 2: e17

Pao W, Miller VA (2005b) Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J Clin Oncol* 23: 2556-2568

Pao W, Ladanyi M (2007) Epidermal growth factor receptor mutation testing in lung cancer: searching for the ideal method. *Clin Cancer Res* 13: 4954-4955

Perez-Soler R, Chachoua A, Hammond LA, Rowinsky EK, Huberman M, Karp D, Rigas J, Clark GM, Santabarbara P, Bonomi P (2004) Determinants of tumor response and survival with erlotinib in patients with non--small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 22: 3238-3247

Peto R, Darby S, Deo H, Silcocks P, Whitley E, Doll R (2000) Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *BMJ* 321: 323-329

Poehlmann A, Kuester D, Meyer F, Lippert H, Roessner A, Schneider-Stock R (2007) K-ras mutation detection in colorectal cancer using the Pyrosequencing technique. *Pathol Res Pract* 203: 489-497

Pollard JW (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4: 71-78

Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A (2001) The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 8: 11-31

Prewett MC, Hooper AT, Bassi R, Ellis LM, Waksal HW, Hicklin DJ (2002) Enhanced antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody IMC-C225 in combination with irinotecan (CPT-11) against human colorectal tumor xenografts. *Clin Cancer Res* 8: 994-1003

R

Remontet L, Esteve J, Bouvier AM, Grosclaude P, Launoy G, Menegoz F, Exbrayat C, Tretare B, Carli PM, Guizard AV, Troussard X, Bercelli P, Colonna M, Halna JM, Hedelin G, Mace-Lesec'h J, Peng J, Buemi A, Velten M, Jougla E, Arveux P, Le Bodic L, Michel E, Sauvage M, Schvartz C, Faivre J (2003) Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Rev Epidemiol Sante Publique* 51: 3-30

Ronaghi M, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P (1998a) PCR-introduced loop structure as primer in DNA sequencing. *Biotechniques* 25: 876-2, 884

Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P (1998b) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281: 363, 365

Rosell R, Robinet G, Szczesna A, Ramlau R, Constenla M, Mennecier BC, Pfeifer W, O'Byrne KJ, Welte T, Kolb R, Pirker R, Chemaissani A, Perol M, Ranson MR, Ellis PA, Pilz K, Reck M (2008) Randomized phase II study of cetuximab plus cisplatin/vinorelbine compared with cisplatin/vinorelbine alone as first-line therapy in EGFR-expressing advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 19: 362-369

S

Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19: 183-232

Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ, Sr., Needle MN, Kopit J, Mayer RJ (2004) Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 22: 1201-1208

Saltz LB, Lenz HJ, Hochster H, et al. (2005) Randomized phase II trial of cetuximab/bevacizumab/irinotecan (CBI) vs cetuximab/bevacizumab (CB) in irinotecan-refractory colorectal cancer. *J Clin Oncol* 23: 3508 abstract

Sanger F (1981) Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 214: 1205-1210

Sant M, Capocaccia R, Coleman MP, Berrino F, Gatta G, Micheli A, Verdecchia A, Faivre J, Hakulinen T, Coebergh JW, Martinez-Garcia C, Forman D, Zappone A (2001) Cancer survival increases in Europe, but international differences remain wide. *Eur J Cancer* 37: 1659-1667

Sato JD, Kawamoto T, Le AD, Mendelsohn J, Polikoff J, Sato GH (1983) Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors. *Mol Biol Med* 1: 511-529

Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, Zhu J, Johnson DH (2002) Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 346: 92-98

Schreiber AB, Lax I, Yarden Y, Eshhar Z, Schlessinger J (1981) Monoclonal antibodies against receptor for epidermal growth factor induce early and delayed effects of epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 7535-7539

Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ, Haber DA (2007) Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 25: 587-595

Shah NT, Kris MG, Pao W, Tyson LB, Pizzo BM, Heinemann MH, Ben Porat L, Sachs DL, Heelan RT, Miller VA (2005) Practical management of patients with non-small-cell lung cancer treated with gefitinib. *J Clin Oncol* 23: 165-174

Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA (2007) Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 7: 169-181

Shepherd FA, Rodrigues PJ, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Martins R, van Kooten M, Dediu M, Findlay B, Tu D, Johnston D, Bezjak A, Clark G, Santabarbara P, Seymour L (2005) Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 353: 123-132

Shields TW (1993) Surgical therapy for carcinoma of the lung. *Clin Chest Med* 14: 121-147

Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Feng Z, Roth JA, Herz J, Minna JD, Gazdar AF (2005) Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 97: 339-346

Sibilia M, Wagner EF (1995) Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 269: 234-238

Sonobe M, Manabe T, Wada H, Tanaka F (2005) Mutations in the epidermal growth factor receptor gene are linked to smoking-independent, lung adenocarcinoma. *Br J Cancer* 93: 355-363

Soung YH, Lee JW, Kim SY, Seo SH, Park WS, Nam SW, Song SY, Han JH, Park CK, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH (2005) Mutational analysis of EGFR and K-RAS genes in lung adenocarcinomas. *Virchows Arch* 446: 483-488

Spiro SG, Porter JC (2002) Lung cancer--where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 1166-1196

Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S (2002) Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 161: 1961-1971

Straight SW, Herman B, McCance DJ (1995) The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J Virol* 69: 3185-3192

Sueoka N, Sato A, Eguchi H, Komiya K, Sakuragi T, Mitsuoka M, Satoh T, Hayashi S, Nakachi K, Sueoka E (2007) Mutation profile of EGFR gene detected by denaturing high-performance liquid chromatography in Japanese lung cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 133: 93-102

Sugio K, Uramoto H, Ono K, Oyama T, Hanagiri T, Sugaya M, Ichiki Y, So T, Nakata S, Morita M, Yasumoto K (2006) Mutations within the tyrosine kinase domain of EGFR gene specifically occur in lung adenocarcinoma patients with a low exposure of tobacco smoking. *Br J Cancer* 94: 896-903

T

Tabernero J, Van Cutsem E, Diaz-Rubio E, Cervantes A, Humblet Y, Andre T, Van Laethem JL, Soulie P, Casado E, Verslype C, Valera JS, Tortora G, Ciardiello F, Kisker O, de Gramont A (2007) Phase II trial of cetuximab in combination with fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 25: 5225-5232

Takano T, Ohe Y, Sakamoto H, Tsuta K, Matsuno Y, Tateishi U, Yamamoto S, Nokihara H, Yamamoto N, Sekine I, Kunitoh H, Shibata T, Sakiyama T, Yoshida T, Tamura T (2005) Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 23: 6829-6837

Tan YH, Liu Y, Eu KW, Ang PW, Li WQ, Salto-Tellez M, Iacopetta B, Soong R (2008) Detection of BRAF V600E mutation by pyrosequencing. *Pathology* 40: 295-298

Thatcher N, Chang A, Parikh P, Rodrigues PJ, Ciuleanu T, von Pawel J, Thongprasert S, Tan EH, Pemberton K, Archer V, Carroll K (2005) Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet* 366: 1527-1537

Thomas RK, Nickerson E, Simons JF, Janne PA, Tengs T, Yuza Y, Garraway LA, LaFramboise T, Lee JC, Shah K, O'Neill K, Sasaki H, Lindeman N, Wong KK, Borras AM, Gutmann EJ, Dragnev KH, DeBiasi R, Chen TH, Glatt KA, Greulich H, Desany B, Lubeski CK, Brockman W, Alvarez P, Hutchison SK, Leamon JH, Ronan MT, Turenchalk GS, Egholm M, Sellers WR, Rothberg JM, Meyerson M (2006) Sensitive mutation detection in heterogeneous cancer specimens by massively parallel picoliter reactor sequencing. *Nat Med* 12: 852-855

Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, LaMantia C, Mourton T, Herrup K, Harris RC, . (1995) Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269: 230-234 of erlotinib versus placebo in the treatment of non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 24: Suppl:365s. abstract

Tsao M, Zhu C, Sakurada A, et al. (2006) An analysis of the prognostic and predictive importance of K-ras mutation status in the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group BR.21 stud

U

Ushiro H, Cohen S (1980) Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J Biol Chem* 255: 8363-8365

V

Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, Canon JL, Van Laethem JL, Maurel J, Richardson G, Wolf M, Amado RG (2007) Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 25: 1658-1664

Vermoken JB, Mesia R, Vega E, et al. (2007) Cetuximab extends survival of patients or recurrent or metastatic SCCHN when added to first line platinium-based therapy results of randomized phase III (EXTREME) study. Late breaking abstract presented at the 43rd American Society of Clinical Oncology Annual Meeting, Chicago, June 1-5

Vignot S, Besse B (2007) [Gemcitabine and non small-cell lung cancer]. *Bull Cancer* 94 Spec No Actualites: S95-103

W

Ward WH, Cook PN, Slater AM, Davies DH, Holdgate GA, Green LR (1994) Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Investigation of catalytic mechanism, structure-based searching and discovery of a potent inhibitor. *Biochem Pharmacol* 48: 659-666

Williams MD, Sandler AB (2001) The epidemiology of lung cancer. *Cancer Treat Res* 105: 31-52

Wu M, Rivkin A, Pham T (2008) Panitumumab: Human monoclonal antibody against epidermal growth factor receptors for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Clin Ther* 30: 14-30

Y

Yarden Y, Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 127-137

Z

Zhang J, Liang ZY, Zeng X, Wu SF, Gao J, Liu TH (2008) [Detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in non-small cell lung cancers by real-time polymerase chain reaction using scorpion amplification refractory mutation system]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 37: 294-299

ANNEXES

Cancer du poumon

Lignes directrices pour le traitement des échantillons et la déclaration du stade des tumeurs

Classification histologique des tumeurs malignes du poumon

Carcinome à petites cellules
Variantes : Carcinome composite à petites cellules
Carcinome épidermoïde
Variantes : Papillaire
A cellules claires
A petites cellules
Basaloïde
Adénocarcinome *
Acineux
Papillaire
Carcinome bronchiolo-alvéolaire
non mucineux (cellules de Clara / pneumocyte de type II)
mucineux (cellules caliciforme)
mixte mucineux et non mucineux
Adénocarcinome solide
Adénocarcinomes avec sous-type mixte
Variantes : Adénome embryonnaire bien différencié
Adénocarcinome mucineux (« colloïde »)
Cystadénocarcinome mucineux
Adénocarcinome à cellules en bague
Carcinome à cellules claires
Carcinome à grandes cellules
Variantes : Carcinome neuro-endocrine à grandes cellules
Carcinome neuro-endocrine composite à grandes cellules
Carcinome basaloïde
Carcinome à type lymphoépithéliome
Carcinome à cellules claires
Carcinome à grandes cellules et rhabdoïde
Carcinome adénosquameux
Carcinome avec éléments pléomorphes, sarcomatoïdes ou sarcomateux
Carcinome à cellules fusiformes ou à cellules géantes
Carcinome pléomorphe
Carcinome à cellules fusiformes
Carcinome à cellules géantes
Carcinosarcome
Blastome pulmonaire
Tumeur carcinoïde
Carcinoïde typique
Carcinoïde atypique
Tumeurs de glandes bronchiques
Carcinome mucoépidermoïde
Carcinome adénoïde kystique
Autres

* Classement : bien différencié, modérément différencié et peu différencié

Annexe I . Classification histologique des tumeurs malignes pulmonaires selon l'OMS
D'après Brambilla et coll., 2001.

RESEAUX DE CANCEROLOGIE RHONE-ALPES ET AUVERGNE
ONCORA - CONCORDE - ONCOLOIRE - ARC ALPIN - ONCAUVERGNE
GROUPE DE TRAVAIL REFERENTIELS COMMUNS DE PROTOCOLES DE CHIMIOTHERAPIE
REFERENTIEL DE BON USAGE - CANCERS THORACIQUES

I- CANCERS BRONCHIQUES NON A PETITES CELLULES (CBNPC)

A- PROTOCOLES ENREGISTRES EN RCP

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique		Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
PEMETREXED EN MONOTHERAPIE	Pemetrexed 500 mg/m² J1 Tous les 21 jours		Localement avancé ou métastatique, si histologie non à prédominance épidermoïde (2ème ligne)	A - I	HANNA ET AL. [16]
CISPLATINE - PEMETREXED	- Cisplatine 75 mg/m² J1 - Pemetrexed 500 mg/m² J1 Tous les 21 jours		Localement avancé ou métastatique, si histologie non à prédominance épidermoïde (1ère ligne)	A - I	SCAGLIOTTI ET AL. [41]
BEVACIZUMAB - CISPLATINE - PEMETREXED	- Bevacizumab 7,5 mg/kg J1 - Cisplatine 75 mg/m² J1 - Pemetrexed 500 mg/m² J1 Tous les 21 jours		Avancé et non opérable, métastatique ou en rechute, si histologie non à prédominance épidermoïde (1ère ligne)	A - I	AMM Bevacizumab Pas de littérature
GEMCITABINE EN MONOTHERAPIE	Gemcitabine 1250 mg/m² J1, J8 Tous les 21 jours	Gemcitabine 1000 mg/m² J1, J8, J15 Tous les 28 jours	Localement avancé ou métastatique	A - I	GRIDELLI ET AL. [13] MANEGOLD ET AL. [28] VANSTEENKISTE ET AL. [54]

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique		Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
CISPLATINE - GEMCITABINE	- Cisplatine 80 mg/m² J1 - Gemcitabine 1250 mg/m² J1, J8 Tous les 21 jours	- Cisplatine 100 mg/m² J1 - Gemcitabine 1000 mg/m² J1, J8, J15 Tous les 28 jours	Localement avancé ou métastatique	A - I	SANDLER ET AL. [39] SMIT ET AL. [46]
BEVACIZUMAB - CISPLATINE - GEMCITABINE	- Bevacizumab 7,5 mg/kg J1 - Cisplatine 80 mg/m² J1 - Gemcitabine 1250 mg/m² J1, J8 Tous les 21 jours	- Bevacizumab 7,5 mg/kg J1 - Cisplatine 100 mg/m² J1 - Gemcitabine 1000 mg/m² J1, J8, J15 Tous les 28 jours	Avancé et non opérable, métastatique ou en rechute, si histologie non à prédominance épidermoïde (1ère ligne)	A - I	MANEGOLD ET AL. [27] AMM Bevacizumab
CARBOPLATINE - GEMCITABINE	- Carboplatine AUC 5 (Calvert) J1 - Gemcitabine 1200 mg/m² J1, J8 Tous les 21 jours		Localement avancé ou métastatique	A - I	RUDD ET AL. [37]
BEVACIZUMAB - CARBOPLATINE - GEMCITABINE	- Bevacizumab 15 mg/kg J1 - Carboplatine AUC 5 (Calvert) J1 - Gemcitabine 1200 mg/m² J1, J8 Tous les 21 jours		Avancé et non opérable, métastatique ou en rechute, si histologie non à prédominance épidermoïde (1ère ligne)	A - I	AMM Bevacizumab Pas de littérature
VINORELBINE INJ EN MONOTHERAPIE	Vinorelbine 30 mg/m² J1, J8 Tous les 21 jours		Métastatique	A - I	GRIDELLI ET AL. [13]
VINORELBINE PER OS EN MONOTHERAPIE	Cures n°1, 2 et 3 Vinorelbine 60 mg/m² J1 Cure n°4 et suivantes Vinorelbine 80 mg/m² J1 Tous les 7 jours		Métastatique	A - I	JASSEM ET AL. [19]

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique	Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
CISPLATINE - VINORELBINE INJ	- **Cisplatine** 80 mg/m² J1 - **Vinorelbine** 30 mg/m² J1, J8 **Tous les 21 jours**	Adjuvant	**A - I**	ARRIAGADA ET AL. [1]
				DOUILLARD ET AL. [4]
				PIGNON ET AL. [34]
				WINTON ET AL. [60]
		Métastatique	**A - I**	GEBBIA ET AL. [11]
				GRIDELLI ET AL. [14]
BEVACIZUMAB - CISPLATINE - VINORELBINE INJ	- **Bevacizumab** 7,5 mg/kg J1 - **Cisplatine** 80 mg/m² J1 - **Vinorelbine** 30 mg/m² J1, J8 **Tous les 21 jours**	Avancé et non opérable, métastatique ou en rechute, si histologie non à prédominance épidermoïde (1ère ligne)	**A - I**	AMM Bevacizumab Pas de littérature
CISPLATINE - VINORELBINE INJ / PER OS	Cure n°1 - **Cisplatine** 80 mg/m² J1 - **Vinorelbine inj** 30 mg/m² J1 - **Vinorelbine per os** 60 mg/m² J8 Cure n°2 et suivantes - **Cisplatine** 80 mg/m² J1 - **Vinorelbine inj** 30 mg/m² J1 - **Vinorelbine per os** 80 mg/m² J8 **Tous les 21 jours**	Métastatique	**A - I**	JASSEM ET AL. [20]
				LENA ET AL. [23]

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique	Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
BEVACIZUMAB - CISPLATINE - VINORELBINE INJ / PER OS	Cure n°1 - **Bevacizumab** 7,5 mg/kg J1 - **Cisplatine** 80 mg/m² J1 - **Vinorelbine inj** 30 mg/m² J1 - **Vinorelbine per os** 60 mg/m² J8 Cure n°2 et suivantes - **Bevacizumab** 7,5 mg/kg J1 - **Cisplatine** 80 mg/m² J1 - **Vinorelbine inj** 30 mg/m² J1 - **Vinorelbine per os** 80 mg/m² J8 **Tous les 21 jours**	Avancé et non opérable, métastatique ou en rechute, si histologie non à prédominance épidermoïde (1ère ligne)	**A - I**	AMM Bevacizumab Pas de littérature
CISPLATINE - VINORELBINE INJ + RT	- **Cisplatine** 80 mg/m² J1 - **Vinorelbine** 15 mg/m² J1, J8 **Tous les 21 jours**	Localement avancé non résécable ou non opérable	**A - I**	VOKES ET AL. [57]
CISPLATINE - ETOPOSIDE + RT	- **Cisplatine** 50 mg/m² J1, J8 - **Etoposide** 50 mg/m² J1 à J5 **Tous les 28 jours**	Localement avancé non résécable ou non opérable	**A - Médicaments non inscrits sur la liste hors GHS**	GANDARA ET AL. [9]
CARBOPLATINE - PACLITAXEL + RT	- **Carboplatine** AUC 2 (Calvert) J1 - **Paclitaxel** 50 mg/m² J1 **Tous les 7 jours**	Localement avancé non résécable ou non opérable, **en cas de contre-indication au cisplatine**	**A - II**	VOKES ET AL. [56]

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique	Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
BEVACIZUMAB EN MONOTHERAPIE	**Bevacizumab** 7,5 ou 15 mg/kg **Tous les 21 jours** **Poursuite du traitement jusqu'à progression de la maladie, après 6 cures du schéma bevacizumab - sels de platine**	Avancé et non opérable, métastatique ou en rechute, si histologie non à prédominance épidermoïde (1ère ligne)	**A - I**	MANEGOLD ET AL. [27] AMM Bevacizumab SANDLER ET AL. [38] AMM Bevacizumab
GEMCITABINE - VINORELBINE INJ	**- Gemcitabine** 1000 mg/m² J1, J8 **- Vinorelbine** 25 mg/m² J1, J8 **Tous les 21 jours**	Localement avancé ou métastatique	**A - I**	GRIDELLI ET AL. [14]
CISPLATINE - PACLITAXEL	**- Cisplatine** 80 mg/m² J1 **- Paclitaxel** 175 mg/m² J1 **Tous les 21 jours**	Avancé ou métastatique (stades IIIB et IV). Patient non candidat à une chirurgie potentiellement curative et/ou à une radiothérapie (1ère ligne)	**A - I**	GATZEMEIER ET AL. [10] GIACCONE ET AL. [12]
BEVACIZUMAB - CISPLATINE - PACLITAXEL	**- Bevacizumab** 7,5 mg/kg J1 **- Cisplatine** 80 mg/m² J1 **- Paclitaxel** 175 mg/m² J1 **Tous les 21 jours**	Avancé et non opérable, métastatique ou en rechute, si histologie non à prédominance épidermoïde (1ère ligne)	**A - I**	AMM Bevacizumab Pas de littérature
CARBOPLATINE - PACLITAXEL	**- Carboplatine** AUC 6 (Calvert) J1 **- Paclitaxel** 200 mg/m² J1 **Tous les 21 jours**	Localement avancé ou métastatique Stades IIIB non irradiables et IV (1ère ligne, **en cas de contre-indication documentée au cisplatine**)	**A - II**	KELLY ET AL. [21] SCAGLIOTTI ET AL. [40] SCHILLER ET AL. [42]

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique	Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
BEVACIZUMAB - CARBOPLATINE - PACLITAXEL	**- Bevacizumab** 15 mg/kg J1 **- Carboplatine** AUC 6 (Calvert) J1 **- Paclitaxel** 200 mg/m² J1 **Tous les 21 jours**	Avancé et non opérable, métastatique ou en rechute, si histologie non à prédominance épidermoïde (1ère ligne)	**A - I**	SANDLER ET AL. [38] AMM Bevacizumab
PACLITAXEL - GEMCITABINE	**- Paclitaxel** 175 mg/m² J1 **- Gemcitabine** 1250 mg/m² J1, J8 **Tous les 21 jours**	Localement avancé ou métastatique (1ère ligne, **en cas de contre-indication documentée au cisplatine**)	**A - II**	SMIT ET AL. [46]
DOCETAXEL EN MONOTHERAPIE	**Docétaxel** 75 mg/m² J1 **Tous les 21 jours**	Localement avancé ou métastatique (≥ 2ème ligne)	**A - I**	FOSSELLA ET AL. [8] SHEPHERD ET AL. [45]
CISPLATINE - DOCETAXEL	**- Cisplatine** 75 mg/m² J1 **- Docétaxel** 75 mg/m² J1 **Tous les 21 jours**	Localement avancé ou métastatique, non résécable (1ère ligne)	**A - I**	FOSSELLA ET AL. [7]
BEVACIZUMAB - CISPLATINE - DOCETAXEL	**- Bevacizumab** 7,5 mg/kg J1 **- Cisplatine** 75 mg/m² J1 **- Docétaxel** 75 mg/m² J1 **Tous les 21 jours**	Avancé et non opérable, métastatique ou en rechute, si histologie non à prédominance épidermoïde (1ère ligne)	**A - I**	AMM Bevacizumab Pas de littérature
GEMCITABINE - DOCETAXEL	**- Gemcitabine** 1000 mg/m² J1, J8 **- Docétaxel** 85 mg/m² J8 **Tous les 21 jours**	Localement avancé non résécable ou métastatique (1ère ligne, **en cas de contre-indication documentée au cisplatine**)	**A - II**	PUJOL ET AL. [36]

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique	Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
CARBOPLATINE - DOCETAXEL	- Carboplatine AUC 6 (Calvert) J1 - Docétaxel 75 mg/m² J1 Tous les 21 jours	Localement avancé non résécable ou métastatique (1ère ligne, en cas de contre-indication documentée au cisplatine)	A - II	FOSSELLA ET AL. [7]
BEVACIZUMAB - CARBOPLATINE-DOCETAXEL	- Bevacizumab 15 mg/kg J1 - Carboplatine AUC 6 (Calvert) J1 - Docétaxel 75 mg/m² J1 Tous les 21 jours	Avancé et non opérable, métastatique ou en rechute, si histologie non à prédominance épidermoïde (1ère ligne)	A - I	AMM Bevacizumab Pas de littérature
ERLOTINIB EN MONOTHERAPIE	Erlotinib 150 mg/j En continu	Localement avancé ou métastatique (≥ 2ème ligne)	A - Médicament non inscrit sur la liste hors GHS	SHEPHERD ET AL. [44]

B- PROTOCOLES DISCUTES EN RCP (DE 1er NIVEAU OU DE RECOURS)
PRESCRIPTION A DEFAUT, PAR EXCEPTION ET EN L'ABSENCE D'ALTERNATIVE THERAPEUTIQUE POUR LE PATIENT

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique	Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
CARBOPLATINE - PACLITAXEL	- Carboplatine AUC 6 (Calvert) J1 - Paclitaxel 200 mg/m² J1 Tous les 21 jours	Adjuvant, en cas de contre-indication documentée au cisplatine et chez des patients PS 0 ou 1 à haut risque de rechute : stades IB (tumeur > 4 cm), II et IIIA	B - Annexe INCa	STRAUSS ET AL. [50]
		Localement avancé ou métastatique Stades IIIB non irradiables et IV (1ère ligne, en l'absence de contre-indication au cisplatine)	B - Protocole absent du référentiel du l'INCa	KELLY ET AL. [21] SCAGLIOTTI ET AL. [40] SCHILLER ET AL. [42]
PACLITAXEL EN MONOTHERAPIE	Paclitaxel 80 mg/m² J1, J8, J15 Tous les 28 jours	Localement avancé ou métastatique (≥ 3ème ligne)	B - Annexe INCa	SOCINSKI ET AL. [47]

C- PROTOCOLES NON AUTORISES

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique	Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
BEVACIZUMAB	-	Formes épidermoïdes ou à potentiel hémorragique important	C - III	-
	-	Formes non épidermoïdes et à potentiel hémorragique faible, en phase péri-opératoire (néoadjuvant, adjuvant)	C - Annexe INCa	-
	-	Formes non épidermoïdes et à potentiel hémorragique faible, en radiochimiothérapie concomitante	C - Annexe INCa	-
	-	Formes non épidermoïdes, stade localement avancé ou métastatique (≥ 2ème ligne)	C - Annexe INCa	-
PEMETREXED	-	Adjuvant	C - Annexe INCa	-
IRINOTECAN	-	-	C - Annexe INCa	-
OXALIPLATINE	-	-	C - Annexe INCa	-
CETUXIMAB	-	-	C - Annexe INCa	-
GEMCITABINE	-	Adjuvant	C - Annexe INCa	-
GEMCITABINE + RT	-	Localement avancé non résécable ou non opérable	C - III	-
POLYCHIMIOTHERAPIE TRIPLET, QUELS QUE SOIENT LES MEDICAMENTS ASSOCIES	-	-	C - Protocole absent du référentiel de l'INCa	-

RESEAUX DE CANCEROLOGIE RHONE-ALPES ET AUVERGNE
ONCORA - CONCORDE - ONCOLOIRE - ARC ALPIN - ONCAUVERGNE

GROUPE DE TRAVAIL REFERENTIELS COMMUNS DE PROTOCOLES DE CHIMIOTHERAPIE

REFERENTIEL DE BON USAGE - CANCERS DIGESTIFS

I- CANCERS COLORECTAUX

A- PROTOCOLES ENREGISTRES EN RCP

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique		Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
TEGAFUR - URACILE EN MONOTHERAPIE	- Tégafur 300 mg/m² J1 à J28 - Acide folinique per os 90 mg J1 à J28 Tous les 35 jours		Métastatique	A - Médicament non inscrit sur la liste hors GHS	CARMICHAEL J [12]
					DOUILLARD JY [28]
CAPECITABINE EN MONOTHERAPIE	Capécitabine 2500 mg/m² J1 à J14 Tous les 21 jours		Adjuvant, stade III (Stade C de Dukes)	A - Médicament non inscrit sur la liste hors GHS	TWELVES C [72]
			Métastatique	A - Médicament non inscrit sur la liste hors GHS	HOFF PM [41]
					VAN CUTSEM E [77]
LV5FU2 -Schéma classique -Schéma simplifié	Schéma classique - Acide folinique R : 200 mg/m² J1, J2 L : 100 mg/m² J1, J2 - 5-Fluoro-uracile 400 mg/m² J1, J2 - 5-Fluoro-uracile 600 mg/m² J1, J2 Tous les 14 jours	Schéma simplifié - Acide folinique R : 400 mg/m² J1 L : 200 mg/m² J1 - 5-Fluoro-uracile 400 mg/m² J1 - 5-Fluoro-uracile 2400 mg/m² J1 (48 h) Tous les 14 jours	Adjuvant	A - Médicaments non inscrits sur la liste hors GHS	ANDRE T [3]
			Métastatique	A - Médicaments non inscrits sur la liste hors GHS	DE GRAMONT A [24]

R = mélange racémique et L = forme lévogyre

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique		Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
FOLFOX 4 -Schéma classique -Schéma simplifié	Schéma classique - Oxaliplatine 85 mg/m² J1 - Acide folinique R : 200 mg/m² J1, J2 L : 100 mg/m² J1, J2 - 5-Fluoro-uracile 400 mg/m² J1, J2 - 5-Fluoro-uracile 600 mg/m² J1, J2 Tous les 14 jours	Schéma simplifié - Oxaliplatine 85 mg/m² J1 - Acide folinique R : 400 mg/m² J1 L : 200 mg/m² J1 - 5-Fluoro-uracile 400 mg/m² J1 - 5-Fluoro-uracile 2400 mg/m² J1 (48 h) Tous les 14 jours	Adjuvant, stade III (Stade C de Dukes)	A - I	ANDRE T [2]
			Métastatique	A - I	DE GRAMONT A [25]
FOLFOX 6	- Oxaliplatine 100 mg/m² J1 - Acide folinique R : 400 mg/m² J1 L : 200 mg/m² J1 - 5-Fluoro-uracile 400 mg/m² J1 - 5-Fluoro-uracile 2400 mg/m² J1 (48 h) Tous les 14 jours		Métastatique	A - I	TOURNIGAND C [71]
FOLFIRI	- Irinotécan 180 mg/m² J1 - Acide folinique R : 400 mg/m² J1 L : 200 mg/m² J1 - 5-Fluoro-uracile 400 mg/m² J1 - 5-Fluoro-uracile 2400 mg/m² J1 (48 h) Tous les 14 jours		Métastatique 1ère ligne	A - I	DOUILLARD JY [27]
					TOURNIGAND C [71]
			Métastatique 2ème ligne	A - II	TOURNIGAND C [71]

R = mélange racémique et L = forme lévogyre

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique		Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
FOLFIRINOX -Schéma FALCONE -Schéma YCHOU	Schéma FALCONE **- Irinotécan** 165 mg/m² J1 **- Oxaliplatine** 85 mg/m² J1 **- Acide folinique** R : 400 mg/m² J1 L : 200 mg/m² J1 **- 5-Fluoro-uracile** 3200 mg/m² J1 (48 h) **Tous les 14 jours**	Schéma YCHOU **- Irinotécan** 180 mg/m² J1 **- Oxaliplatine** 85 mg/m² J1 **- Acide folinique** R : 400 mg/m² J1 L : 200 mg/m² J1 **- 5-Fluoro-uracile** 400 mg/m² J1 **- 5-Fluoro-uracile** 2400 mg/m² J1 (48 h) **Tous les 14 jours**	Métastatique 1ère ligne A réserver aux patients pour lesquels un traitement médical complémentaire à la chimiothérapie pourrait être envisagé	**A - II**	FALCONE A [30] YCHOU M [80]
BEVACIZUMAB - LV5FU2 -Schéma classique -Schéma simplifié	Schéma classique **- Bévacizumab** 5 mg/kg J1 **- Acide folinique** R : 200 mg/m² J1, J2 L : 100 mg/m² J1, J2 **- 5-Fluoro-uracile** 400 mg/m² J1, J2 **- 5-Fluoro-uracile** 600 mg/m² J1, J2 **Tous les 14 jours**	Schéma simplifié **- Bévacizumab** 5 mg/kg J1 **- Acide folinique** R : 400 mg/m² J1 L : 200 mg/m² J1 **- 5-Fluoro-uracile** 400 mg/m² J1 **- 5-Fluoro-uracile** 2400 mg/m² J1 (48 h) **Tous les 14 jours**	Métastatique	**A - I**	HURWITZ H [42]
BEVACIZUMAB - FOLFIRI	**- Bévacizumab** 5 mg/kg J1 **- Irinotécan** 180 mg/m² J1 **- Acide folinique** R : 400 mg/m² J1 L : 200 mg/m² J1 **- 5-Fluoro-uracile** 400 mg/m² J1 **- 5-Fluoro-uracile** 2400 mg/m² J1 (48 h) **Tous les 14 jours**		Métastatique	**A - I**	HURWITZ H [42]

R = mélange racémique et L = forme lévogyre

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique		Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
BEVACIZUMAB - FOLFOX 4 -Schéma classique -Schéma simplifié	Schéma classique **- Bévacizumab** 5 mg/kg J1 **- Oxaliplatine** 85 mg/m² J1 **- Acide folinique** R : 200 mg/m² J1, J2 L : 100 mg/m² J1, J2 **- 5-Fluoro-uracile** 400 mg/m² J1, J2 **- 5-Fluoro-uracile** 600 mg/m² J1, J2 **Tous les 14 jours**	Schéma simplifié **- Bévacizumab** 5 mg/kg J1 **- Oxaliplatine** 85 mg/m² J1 **- Acide folinique** R : 400 mg/m² J1 L : 200 mg/m² J1 **- 5-Fluoro-uracile** 400 mg/m² J1 **- 5-Fluoro-uracile** 2400 mg/m² J1 (48 h) **Tous les 14 jours**	Métastatique	**A - I**	GIANTONIO BJ [36] SALTZ L [66]
BEVACIZUMAB - XELOX	**- Bévacizumab** 7,5 mg/kg J1 **- Oxaliplatine** 130 mg/m² J1 **- Capécitabine** 2000 mg/m² J1 à J14 **Tous les 21 jours**		Métastatique	**A - I**	SALTZ L [66]
CETUXIMAB - IRINOTECAN -Schéma classique -Schémas simplifiés	Schéma classique *Cure n°1* **- Cétuximab** 400 mg/m² J1 250 mg/m² J8 **- Irinotécan** 180 mg/m² J1 *Cure n°2 et suivantes* **Reprise à J15** **- Cétuximab** 250 mg/m² J15, J22 **- Irinotécan** 180 mg/m² J15 **Tous les 14 jours**	Schémas simplifiés ** Schéma n°1* **- Cétuximab** 500 mg/m² J1 **- Irinotécan** 180 mg/m² J1 **Tous les 14 jours** ** Schéma n°2* *Cure n°1* **Cure n°1 du schéma classique** *Cure n°2 et suivantes* **Reprise à J15 avec le schéma simplifié n°1** **Tous les 14 jours**	Métastatique ≥ 2ème ligne avec expression EGFR	**A - I**	CUNNINGHAM D [19]
			Métastatique ≥ 2ème ligne quelle que soit l'expression EGFR	**A - II**	CHUNG KY [14] PIPPAS AW [61]
IRINOTECAN EN MONOTHERAPIE	**Irinotécan** 350 mg/m² J1 **Tous les 21 jours**		Métastatique	**A - I**	CUNNINGHAM D [20] ROUGIER P [65]

R = mélange racémique et L = forme lévogyre

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique	Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
RALTITREXED EN MONOTHERAPIE	**Raltitrexed** 3 mg/m² J1 **Tous les 21 jours**	Métastatique (Patient non traité par fluoropyrimidines)	**A - I**	COCCONI G [15]
		Métastatique (Contre-indication ou intolérance aux fluoropyrimidines)	**A - II**	KOHNE CH [46]
TOMOX	**- Raltitrexed** 3 mg/m² J1 **- Oxaliplatine** 130 mg/m² J1 **Tous les 21 jours**	Métastatique (Contre-indication ou intolérance aux fluoropyrimidines)	**A - II**	SEITZ JF [67]
PANITUMUMAB EN MONOTHERAPIE	**Panitumumab** 6 mg/kg J1 **Tous les 14 jours**	Métastatique ≥ 2ème ligne avec expression EGFR Patient KRAS non muté (type sauvage)	**A - Médicament non inscrit sur la liste hors GHS**	VAN CUTSEM E [76]
CAPECITABINE EN MONOTHERAPIE + RT	**Capécitabine** 1650 mg/m²/j **Pendant toute la durée de la radiothérapie (sauf week-ends et jours fériés)**	**Rectum** Néoadjuvant	**A - Médicament non inscrit sur la liste hors GHS**	KRISHNAN S [47]

B- PROTOCOLES DISCUTES EN RCP (DE 1er NIVEAU OU DE RECOURS)

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique		Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
FOLFOX 4 -Schéma classique -Schéma simplifié	Schéma classique **- Oxaliplatine** 85 mg/m² J1 **- Acide folinique** R : 200 mg/m² J1, J2 L : 100 mg/m² J1, J2 **- 5-Fluoro-uracile** 400 mg/m² J1, J2 **- 5-Fluoro-uracile** 600 mg/m² J1, J2 **Tous les 14 jours**	Schéma simplifié **- Oxaliplatine** 85 mg/m² J1 **- Acide folinique** R : 400 mg/m² J1 L : 200 mg/m² J1 **- 5-Fluoro-uracile** 400 mg/m² J1 **- 5-Fluoro-uracile** 2400 mg/m² J1 (48 h) **Tous les 14 jours**	Adjuvant, stade II à haut risque	**B - Annexe INCa**	ANDRE T [2] DE GRAMONT A [23]
XELOX	**- Oxaliplatine** 130 mg/m² J1 **- Capécitabine** 2000 mg/m² J1 à J14 **Tous les 21 jours**		Métastatique	**B - Protocole absent du référentiel de l'INCa**	CASSIDY J [13]

R = mélange racémique et L = forme lévogyre

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique		Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
CETUXIMAB - FOLFIRI -Schéma classique -Schémas simplifiés	Schéma classique *Cure n°1* **- Cétuximab** 400 mg/m² J1 250 mg/m² J8 **- Irinotécan** 180 mg/m² J1 **- Acide folinique** R : 400 mg/m² J1 L : 200 mg/m² J1 **- 5-Fluoro-uracile** 400 mg/m² J1 **- 5-Fluoro-uracile** 2400 mg/m² J1 (48 h) **Tous les 14 jours** *Cure n°2 et suivantes* **Reprise à J15** **- Cétuximab** 250 mg/m² J15, J22 **- Irinotécan** 180 mg/m² J1 **- Acide folinique** R : 400 mg/m² J1 L : 200 mg/m² J1 **- 5-Fluoro-uracile** 400 mg/m² J1 **- 5-Fluoro-uracile** 2400 mg/m² J1 (48 h) **Tous les 14 jours**	Schémas simplifiés **** Schéma n°1*** **- Cétuximab** 500 mg/m² J1 **- Irinotécan** 180 mg/m² J1 **- Acide folinique** R : 400 mg/m² J1 L : 200 mg/m² J1 **- 5-Fluoro-uracile** 400 mg/m² J1 **- 5-Fluoro-uracile** 2400 mg/m² J1 (48 h) **Tous les 14 jours** **** Schéma n°2*** *Cure n°1* **Cure n°1 du schéma classique** *Cure n°2 et suivantes* **Reprise à J15 avec le schéma simplifié n°1** **Tous les 14 jours**	Métastatique 1ère ligne quelle que soit l'expression EGFR	**B - Protocole absent du référentiel de l'INCa**	VAN CUTSEM E [75]
FOLFIRI FORT Escalade de dose	**- Irinotécan** 180 mg/m² J1 (1ère cure), puis 220 mg/m² J1 (2ème cure) et 260 mg/m² J1 (3ème cure) **- Acide folinique** R : 400 mg/m² J1 L : 200 mg/m² J1 **- 5-Fluoro-uracile** 400 mg/m² J1 **- 5-Fluoro-uracile** 2400 mg/m² J1 (48 h) **Tous les 14 jours**		Métastatique 1ère ligne	**B - Protocole absent du référentiel de l'INCa**	DUCREUX M [29]

R = mélange racémique et L = forme lévogyre

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique		Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
TOMIRI ou IRITOM -Schéma classique -Schéma simplifié	Schéma classique - **Raltitrexed** 3 mg/m² J1 - **Irinotécan** 300 mg/m² J1 **Tous les 21 jours**	Schéma simplifié - **Raltitrexed** 2 mg/m² J1 - **Irinotécan** 180 mg/m² J1 **Tous les 14 jours**	Métastatique (Contre-indication ou intolérance aux fluoropyrimidines)	B - **Protocole absent du référentiel de l'INCa**	APARICIO J [5] FELIU J [31] FELIU J [32] LOSA F [51]

C- PROTOCOLES NON AUTORISES

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique	Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
FOLFIRI	-	Adjuvant	C - **III**	-
BEVACIZUMAB EN MONOTHERAPIE	-	Adjuvant Métastatique	C - **III**	-
BEVACIZUMAB EN ASSOCIATION	-	Adjuvant	C - **Annexe INCa**	-
CETUXIMAB	-	Adjuvant	C - **Annexe INCa**	-
PEMETREXED	-	Métastatique	C - **III**	-
VINORELBINE	-	Métastatique	C - **III**	-
OXALIPLATINE + RT EN ASSOCIATION (FOLFOX 4 + RT et XELOX + RT)	-	**Rectum** Néoadjuvant	C - **Annexe INCa**	-

Concordance of the Determination of EGFR and K-ras Mutations in a Tumor bank obtained by 15 centers in France : a pilot study of the ERMETIC project.

Cadranel J, Poulot V, Rolland E, Mounawar M, Antoine M, Brambilla E, Danel C, Hainaut P, Chouaid C, Michiels S for the ERMETIC group. Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris; Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique (IFCT), Paris; International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon; Centre Hospitalo-Universitaire de Grenoble, Grenoble; Institut Gustave Roussy (IGR), Villejuif - France.

ABSTRACT

Background: Epidermal Growth Factor - Tyrosine Kinase Inhibitors (EGFR-TKIs) and especially erlotinib, are authorized in Europe for the treatment of metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC) after failure of, at least one, prior chemotherapy. Although, it has been suggested that biological markers (EGFR over-expression, EGFR gene polysomy/amplification and EGFR and K-ras mutations) are predictive of efficacy of EGFR-TKIs, they are not used in clinical practice. In order to help implementation of these biomarkers in France, the French National Cancer Institute has granted a 2-year multicentric prospective project entitled: Evaluation of the EGFR Mutation status for the administration of EGFR-TKIs in non small cell lung Carcinoma (ERMETIC). ERMETIC was constituted by 15 regional centers in France, among which an expert pathologists panel was formed, and an external reference molecular laboratory. ERMETIC has several consecutive objectives, but the first was to evaluate the ability of each center to perform biomarker assays in paraffin embedded tissues and the concordance of their results between centers, with the expert pathologists panel and an external molecular reference laboratory.

Methods: A tumor bank was composed by centrally collected specimens from non-previously treated patients that underwent surgery. It was enriched by specimens harboring EGFR-mutation or obtained from non-smokers (NS) and females (F) with adenocarcinoma (ADC). The bank consisted of snap frozen and paraffin embedded tissues, as well as DNA extracts. All specimens were send blinded to the different centers for molecular analysis. EGFR IHC and FISH were performed by the 3 panel pathologists on the entire tumor bank. EGFR and K-ras genes were sequenced by centers on their own specimens as well as on the DNA extracts of the entire bank, and by the molecular reference laboratory on all the DNA samples but also on the snap frozen specimens. Concordance results are presented by the percentage of discordant results, and by kappa coefficients for observer agreement, together with 95% confidence intervals.

Results: The tumor bank contained specimens from 74 surgically resected NSCLC of which 16% with known EGFR-mutation and 74% with ADC histology. 76% of patients were F and 49% NS. At the time of the abstract submission, all EGFR IHC and FISH analyses and EGFR and K-ras mutation sequences have been completed. Definitive concordance results will be presented at the IASLC meeting.

Conclusions: The ability to study EGFR-TKIs predictive biomarkers of efficacy in paraffin embedded tumor specimens by routine laboratories and their capacity to give concordant results are a prerequisite to the implementation of these techniques in the clinical practice in France.

Legends

- Figures 1 to 3
  - Blinded DNA sample □
  - Local DNA sample △
- Figures 1 to 6, 8 and 10
  - Absence of tumor specimens
  - Failure of DNA amplification
  - Wild type sequence
  - Mutated sequence
  - Kappa test not applicable NA
- Figures 11, 13 and 15
  - Non amplified in reference center
  - Wild type in reference center
  - Mutated in reference and local center
  - Wild type on local center
  - Non amplified in local center

Background

Epidermal Growth Factor Receptor - Tyrosine Kinase Inhibitors (EGFR-TKIs), and especially Erlotinib, are authorized in Europe for the treatment of metastatic non-small cell lung carcinoma (NSCLC) after failure of, at least one, prior chemotherapy (CT).

Although, it has been suggested that biomarkers (EGFR over-expression, EGFR gene polysomy/amplification and EGFR and K-Ras mutations) are predictors of EGFR-TKIs efficacy, they are not used in clinical practice.

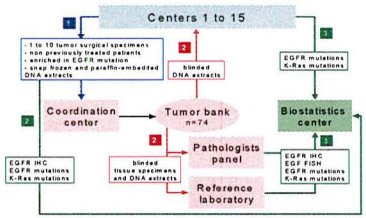
In order to help implementation of these biomarkers in France, the French National Cancer Institute and French Ministry for Health have granted a 2-year multicentric prospective project entitled : Evaluation of the EGFR Mutation status for the administration of EGFR-TKIs in non-small lung Carcinoma (ERMETIC).

Global objectives

ERMETIC project has three consecutive objectives :

- ERMETIC 1 : to validate several techniques for the detection of molecular alterations in the EGFR pathway applicable on paraffin-embedded small-biopsy specimens obtained from NSCLC
- ERMETIC 2 : to select and hierarchized clinical, pathological and biological predictors of EGFR-TKIs response and clinical benefit based on a large prospective clinical cohort
- ERMETIC 3 : to determine the best strategy to prescribe EGFR-TKIs i.e. based or not on EGFR-TKIs biomarkers of response, in term of cost-effectiveness

ERMETIC 1 study design



Tumor bank

74 tumor surgical specimens

- 56 females (76%), 18 males (24%)
- non previously treated patients
- 53 adenocarcinomas (72%), 11 squamous cell carcinomas (15%), 10 large cell carcinomas (13%)
- 30% to 90% of tumoral cells
- "enriched" for EGFR mutation
  - 12 with established EGFR mutations (16%)
  - 38 adenocarcinomas from non-smokers (72%)

Methods

EGFR mutations

- direct sequencing of exons 18 to 21 ; alternative techniques optionnal

K-Ras mutations

- direct sequencing of exon 2 ; alternative techniques optionnal

Statistics

Descriptive analysis

- frequency of non-amplified specimen for each exon of EGFR and K-Ras
- frequency of wild type and mutated exons of EGFR and K-Ras
- description of each mutation using the nomenclature of the Human Genome Variation Society (http://www.hgvs.org/mutnomen/)
- description of concordance and discordance results for each exon ; agreement analysis by "kappa" test [≤0 to 1] :
  - between snap frozen and paraffin-embedded specimens for the reference laboratory
  - between each center and the reference laboratory
  - between local and blinded specimens for each center

Kappa	Agreement
≤0	Very bad (1)
0-0.20	Bad (2)
0.21-0.40	Poor (3)
0.41-0.60	Moderate (4)
0.61-0.80	Good (5)
>0.80	Excellent (6)

Results

All centers : blinded vs local specimens

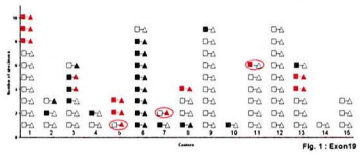


Fig. 1 : Exon19

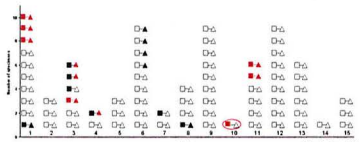


Fig. 2 : Exon21

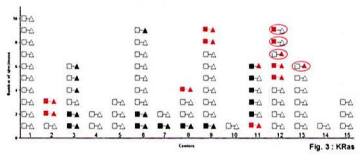


Fig. 3 : KRas

For exon19, 6 centers obtained identical DNA sequences on their blinded and unblinded tumor samples. In Y centers, DNA amplification was executable in blinded samples but not in unblinded and inversely. Finally, in 3 centers mutation was detected in unblinded but not in blinded specimen (n=2) and conversely (n=1).

For exon21, 10 centers obtained identical DNA sequences on their blinded and unblinded tumor samples. In 4 centers, DNA amplification was executable in blinded samples but not in unblinded and inversely. Finally, in 1 center mutation was detected in blinded but not in unblinded specimen.

For KRas, 10 centers obtained identical DNA sequences on their blinded and unblinded tumor samples. In 3 centers, DNA amplification was executable in blinded samples but not in unblinded and inversely. Finally, in 2 centers mutation was detected in unblinded but not in blinded specimen (n=2) and conversely (n=2).

Reference laboratory : frozen vs paraffin

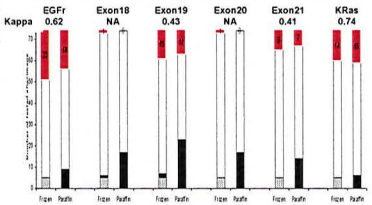


Fig. 4 : EGFr

5 of the 74 frozen specimens did not contain any tumor cells, but DNA amplification was executable for each exon in each 69 tumor specimens. By contrast, DNA amplification was not executable in 9/74 (12%) paraffin specimens for EGFR (exon 18 : 17/74 ; exon 19 : 23/74 ; exon 20 : 17/74 and exon 21: 14/74) and 6/74 (8%) for K-Ras.
23 (33%) EGFR mutations were identified in 69 amplified frozen specimens among which 21/23 (91%) concerned exons 19 and 21. 18 (27%) EGFR mutations were identified in 65 paraffin specimens among which all (100%) concerned exons 19 and 21. 100% of the mutations were detected in ADC and **52% in smokers**.
14 (22%) K-Ras mutations were identified in 68 amplified frozen specimens. 15 (22%) K-Ras mutations were identified in amplified paraffin specimens. 100% of the mutations were detected in ADC and **40% in non-smokers**.
Good agreement existed between results obtained from frozen and paraffin specimens (K=0.62 for EGFR; K=0.72 for K-Ras). Mismatch results were related to absence of tumor cells in frozen specimens and non executable

All centers versus reference center

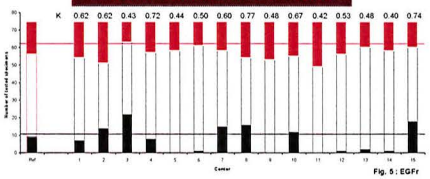


Fig. 5 : EGFr

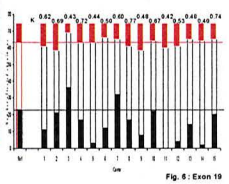


Fig. 6 : Exon 19

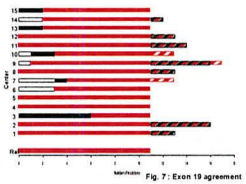


Fig. 7 : Exon 19 agreement

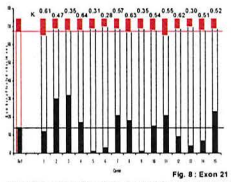


Fig. 8 : Exon 21

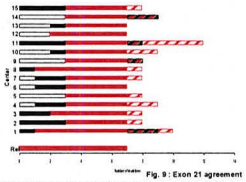


Fig. 9 : Exon 21 agreement

Only 1 local center detected the same number of EGFR mutations as the reference center (18), 5 detected more (20 to 23), but 9 centers detected less numbers (11 to 17).

Moderate (60%) to good (40%) agreement was observed in results obtained by local centers in comparison with the reference center for the identification of EGFR mutations. Agreement was better for EGFR exon19 mutations (moderate: 60%; good: 40%) than for EGFR exon 21 mutations (poor: 33%; moderate: 60%; good: 27%).

However, disagreement between local and reference center resulted from different grounds :

- In 9 local centers with moderate agreement for EGFR exon19 mutation identification, 4 did not detect EGFR mutations identified by the reference center, but 5 detected mutations in DNA specimens that were not amplified or considered as wild type by the reference center
- In 11 local centers with moderate or poor agreement for EGFR exon21 mutation identification, 2 did not detect EGFR mutations identified by the reference center, but 9 detected mutations in DNA specimens that were not amplified or considered as wild type by the reference center and were not able to amplify specimens identified as mutated by the reference center

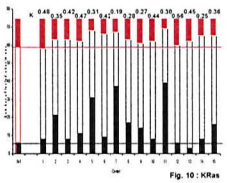


Fig. 10 : KRas

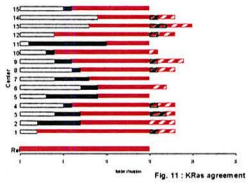


Fig. 11 : KRas agreement

All local centers detected less number of K-Ras mutations (5 to 14) than reference center (15), except 1 that detected more mutations (16).

Moderate agreement was observed in results obtained by local centers in comparison with the reference center for the identification of K-Ras mutations in only 47%, and unexpectedly poor or bad in 53% of cases.

Disagreement between local and reference center mainly resulted from the absence of detection of K-Ras mutations by local centers because of failure of DNA amplification or mis-identification of mutation after sequencing. In several cases, local centers also detected mutations in DNA specimens that were not amplified or considered as wild type by the reference center.

Conclusion

Acceptable agreement between different centers for sequencing EGFr and K-Ras mutations on paraffin blocks

Implementation of quality procedures to enhance concordance between centers

Green light for start of prospective study of 600 patients (ERMETIC2)

Annexe IV – Poster présenté au congrès international de l'IASLC en 2007

Thèse soutenue par : Sandrine DUFORT

Titre :

Marqueurs moléculaires et thérapies ciblées : exemple des mutations de l'*EGFR* et de *KRAS* comme marqueurs prédictifs de réponse aux agents ciblant l'EGFR

Résumé :

Les cancers broncho-pulmonaires (CBNPC) et colorectaux sont les deux premières causes de mortalité par cancer dans le monde. Détectés tardivement, ils sont de très mauvais pronostic, avec une survie à 5 ans respectivement de 12 % et 5 %. Récemment, de nouvelles thérapies dites ciblées, comme par exemple les anticorps monoclonaux anti-EGFR ou les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase (TKI) de l'EGFR, ont été développées. Une faible proportion des patients porteurs d'un cancer broncho-pulmonaire ou colorectal répond à ces traitements ; leur survie est augmentée et leur qualité de vie améliorée. Différentes études ont permis de préciser les facteurs prédictifs de réponse, tels que les mutations des exons 18 à 21 de l'*EGFR* et celles de l'exon 1 de *KRAS*. Ainsi, les anticorps monoclonaux sont indiqués dans le traitement du cancer colorectal métastatique lorsque *KRAS* est sauvage. Pour le traitement des CBNPC par TKIs, le statut mutationnel de l'*EGFR* est en cours d'évaluation.

Au laboratoire, l'analyse des mutations a dans un premier temps été réalisée par la méthode de référence, le séquençage direct, puis une technique alternative, le pyroséquençage a été développée. Cette méthode est plus sensible, plus rapide et moins coûteuse, et permet une prise en charge optimale des patients pouvant bénéficier d'une thérapie ciblant l'EGFR.

Mots clés : thérapie ciblée, cancer, marqueur prédictif, EGFR, KRAS, pyroséquençage

Jury : Monsieur le Pr Patrice Faure – Président du jury
Madame le Dr Juliette Vergnaud
Monsieur le Pr Denis Moro-Sibilot
Madame le Pr Sylvie Lantuejoul
Madame le Dr Florence de Fraipont - Directeur de Thèse