



**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES**

Spécialité : **Immunologie**

Ecole doctorale :

Biochimie, Biothérapies, Biologie Moléculaire et Infectiologie - B3MI

Présentée par

Mme Audrey MANSUET-LUPO

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Sujet de la thèse :

**« Influence des caractéristiques morphologiques et mutationnelles
des carcinomes pulmonaires sur leur environnement immunitaire
et leur pronostic »**

Soutenue le 4 juillet 2014, devant le jury composé de :

Président du Jury

Professeur Pierre Laurent-Puig

Rapporteur

Professeur Karen Leroy

Rapporteur

Professeur Christos Chouaid

Examineur

Professeur Marie-Christine Copin

Examineur

Professeur Franck Pagès

Directrice de thèse

Professeur Diane Damotte

Laboratoire d'accueil :

INSERM U1138 (Pr Isabelle Cremer et Dr Jean-Luc Teillaud)

« Cancer et Immunité anti tumorale »

Centre de Recherche des Cordeliers

15, rue de l'école de Médecine

75270 Paris Cedex 06

Collaboration :

INSERM U1147 (Pr Pierre Laurent Puig)

« Médecine Personnalisée, Pharmacogénomique, Optimisation Thérapeutique »

Université Paris Descartes

45 rue des Saints-Pères

75270 Paris cedex 06

REMERCIEMENTS

Je remercie Monsieur le Professeur Pierre Laurent-Puig de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Je voudrais également exprimer ma plus profonde reconnaissance aux Professeurs Karen Leroy et Christos Chouaïd d'avoir été rapporteurs de cette thèse.

Je remercie Madame le Professeur Marie-Christine Copin et Monsieur le Professeur Frank Pagès d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à Madame le Professeur Diane Damotte, ma directrice de thèse. Merci tout d'abord d'avoir soutenu ma candidature d'AHU dans le service de Pathologie de l'Hôtel Dieu puis pour m'avoir proposé ce sujet de recherche tout à fait adapté à mon intérêt pour la biologie moléculaire. Tu m'as fait confiance, m'as conseillé, et surtout encouragé pour ce travail de thèse. Merci Diane pour ta disponibilité et ta patience qui m'ont été d'une grande aide. J'espère que je passerai encore quelques années de ma carrière à tes côtés pour tous les bons moments que nous passons ensemble.

Je tiens à adresser mes remerciements à Madame le Professeur Catherine Sautès-Fridman et à Monsieur le Professeur Hervé Wolf Fridman pour l'accueil qu'ils m'ont réservé au sein de leur laboratoire.

Je remercie également Madame le Professeur Isabelle Cremer et Monsieur le Docteur Jean-Luc Teillaud pour leur accueil au sein de l'équipe 13, qu'ils dirigent.

Ce travail est le résultat d'une étroite collaboration avec l'équipe de chirurgie thoracique dirigée par Monsieur le Professeur Jean-François Régnaud. Je tiens particulièrement à remercier Monsieur le Professeur Marco Alifano qui a initié le travail en créant la cohorte qui porte maintenant son nom. Marco, je suis très reconnaissante de l'intérêt que tu portes à mon parcours professionnel, j'admire ton professionnalisme et j'apprécie notre collaboration. Merci à Antonio pour avoir débuté l'écriture d'un des articles de cette thèse et pour son attitude toujours zen. Merci à Pierre pour sa bonne humeur et sa sympathie même s'il en

profite pour demander des extemporanés tardives. Enfin, j'adresse toute ma gratitude à Jean-François Régnard, pour sa disponibilité, notre bonne entente et tout mon respect pour sa grande compétence.

Je remercie l'ensemble de l'équipe 13 pour leur sympathie et leur accueil. Merci à Jérémy pour l'aide et le temps qu'il m'a accordé, pour les premières « stat », et pour m'avoir remonté le moral en fin de thèse. Merci à Etienne le matheux, « X-man », pour sa disponibilité, il nous fallait bien 2 à 3 écrans d'ordinateur pour manipuler toutes ses données ; je lui souhaite bon courage pour sa fin de thèse. Merci à Hanane pour son travail consciencieux sur la cohorte, pour avoir écrit mes mails « in english » aux fournisseurs, et pour nos rigolades. Merci à Claire pour sa gentillesse et son aide lors des derniers comptages CD8. Merci à Jérôme pour son humilité, tu aurais été effectivement un bon anat-path. Merci à Romain, « le New Yorkais », pour son travail acharné et de grande qualité. Je souhaite bon courage à Mikael pour l'expérience qu'il s'apprête à vivre. Enfin, je n'oublie pas Samantha, Lucile, Mélanie, Tessa, Nicolas, Laetitia, Nathalie, Eliane, et Johanna pour leur gentillesse. Merci aux « séniors », Marie-Caroline pour m'avoir supporté dans son bureau lors de la fin de la rédaction de la thèse et Isabelle pour sa conduite (en voiture) exemplaire.

Je remercie également l'ensemble de l'équipe Inserm des Saints Pères, dirigé par le Professeur Pierre Laurent-Puig, qui m'a accueilli pour la réalisation des manips de biologie moléculaire, particulièrement Audrey Didelot pour son aide technique et sa rigueur dans le travail. Je souhaite remercier vivement le Docteur Hélène Blons, pour m'avoir enseigné la biologie moléculaire des tumeurs pulmonaires. Hélène, tes connaissances et ta pratique sont d'une grande qualité, c'est un grand plaisir de travailler avec toi.

Je tiens à remercier également tous les membres du service de Pathologie de l'Hôtel Dieu. Je remercie tout d'abord madame le Professeur Josée Audouin que j'ai connue au tout début de mon internat, je la remercie pour ses conseils avisés et son soutien dans mes choix de carrière. Je remercie également monsieur le Professeur Thierry Molina, mon premier chef de service ; c'était un grand plaisir de travailler avec lui. A Monsieur le Professeur Diebold, voisin de bureau, qu'il reçoive toute mon admiration pour sa longue et prestigieuse carrière. Merci au Docteur Agnès Letourneau pour son enseignement en hématopathologie. Merci au Docteur Marie-Christine Charpentier, pour son écoute, son aide et ses encouragements, Marie-Christine, le service ne serait pas le même sans toi. Merci au Docteur Danielle Hugol, pour sa

disponibilité dans les échanges de gardes de dernière minute. Enfin, je remercie le Docteur Barbara Burroni, d'avoir accepté de réintégrer notre équipe.

Merci à Véronique Ducruit et Francis Devez pour leur travail de qualité et leur aide précieuse lors du travail de cette thèse. Merci à Serge Bain pour son art dans les techniques d'immunohistochimie et son acharnement à mettre au point ALK. Merci à Béatrice Marmey pour la réalisation des techniques FISH ; ce n'était pas facile tous les jours... Merci à Patricia Bonjour pour le nombre de lames blanches qu'elle a coupé (en fait 25 multiplié par plus de 500 tumeurs, je n'ose pas faire le calcul...). Merci à Patricia Ansquer pour m'avoir aidé à garder de l'ordre dans toutes les lames de ma thèse. Merci à tous les autres membres du service, Françoise, Jean-Paul, Gérard, Edith, Isabelle, Elsa, Laurent, Jennifer, Leslie et Gladys, pour leur travail consciencieux, leur bonne humeur et leur sympathie.

Je souhaite également remercier l'ensemble du personnel du service de Pathologie de l'hôpital Cochin pour leur accueil. Merci à Madame le Professeur Marie-Cécile Vacher-Lavenu, ma chef de service, pour son acharnement dans la réorganisation du service.

Enfin, je n'oublie pas les Professeurs Pierre Bedossa et Valérie Paradis qui m'ont donné le goût de la recherche dès mon premier semestre d'internat et m'avaient fait connaître et apprécier la pathologie pendant mon externat.

Je ne peux évidemment pas finir ce chapitre sans remercier ma famille, mes parents pour leur soutien au cours de ces très longues années d'études, pour leur amour, pour leur aide et leur disponibilité avec nos enfants ; mon mari Lionel qui a dû me supporter pendant tous les moments difficiles de la rédaction de cette thèse ; Lionel je ne sais pas si j'aurai pu y arriver sans ta bienveillance, ton attention bref sans toi ; et enfin je dédie cette thèse à mes enfants qui ont dû, eux aussi, supporter mes sautes d'humeur, mon temps passé le week-end à travailler, plutôt qu'à s'occuper d'eux. J'espère qu'ils auront la chance, dans leur vie future, d'apprécier leur travail comme j'apprécie le mien.

« Les médecins administrent des médicaments dont ils savent très peu, à des malades dont ils savent moins, pour guérir des maladies dont ils ne savent rien ». Voltaire

« Il faut guérir le cancer de fumer ». Anonyme

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIERES	7
TABLE DES FIGURES.....	10
TABLE DES TABLEAUX.....	12
RESUME.....	14
ABSTRACT	15
ABREVIATIONS	16
INTRODUCTION.....	18
1) Epidémiologie.....	19
2) Les facteurs de risque.....	21
3) Les différents types histologiques de tumeurs pulmonaires	25
4) Les facteurs pronostiques des carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules ..	29
4.1. Les facteurs cliniques et biologiques	29
4.2. Les facteurs histologiques	29
4.2.1. La classification TNM 2009	30
4.2.2. La classification IASLC/ATS/ERS des adénocarcinomes pulmonaires.....	36
5) La prise en charge thérapeutique des carcinomes pulmonaires	44
6) Les altérations moléculaires des CBPNPC	47
6.1. Le récepteur à l'EGF	47
6.2. La protéine KRAS	52
6.3. La protéine BRAF	53
6.4. Le récepteur HER2.....	54
6.5. Les réarrangements du gène <i>ALK</i>	55
7) Associations d'anomalies moléculaires avec le sous-type histologique des adénocarcinomes	62
8) Les principales thérapies ciblées des CBPNPC	63

8.1. Les thérapies ciblées anti-EGFR	63
8.2. Les thérapies ciblées anti-ALK	67
8.3. Les autres thérapies ciblées	68
9) Système immunitaire et cancer	70
9.1. Les origines de l'immunité anti-tumorale	70
9.2. Les acteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale.....	71
9.2.1. Les cellules du système immunitaire inné	71
9.2.2. Les cellules du système immunitaire adaptatif.....	73
9.3. La réponse immunitaire anti-tumorale ou théorie des 3E : Elimination, Equilibre, Echappement	76
9.4. Le microenvironnement tumoral	78
9.6. Le rôle des cellules immunitaires dans le pronostic des tumeurs	83
OBJECTIFS DE LA THESE	85
PARTIE I : Etude de la valeur pronostique de la classification IASLC/ATS/ERS des adénocarcinomes pulmonaires et corrélation avec le statut mutationnel	86
Introduction	86
Patients et méthodes	87
Résultats	89
Discussion	100
Conclusion.....	101
PARTIE II : Etude de la distribution des mutations et du nombre de copies du gène <i>EGFR</i> dans une série caucasienne d'adénocarcinomes pulmonaires, et de son impact sur le diagnostic moléculaire initial	102
Introduction	102
Patients et méthodes	103
Résultats	106
Discussion	113
Conclusion.....	117

PARTIE III : Analyse de l'impact des caractéristiques morphologiques et moléculaires des cellules tumorales sur leur environnement immunitaire dans les adénocarcinomes pulmonaires	118
Introduction	118
Patients et méthodes	120
Résultats	123
Discussion	131
Conclusion.....	132
PARTIE IV : Valeur pronostique de la réponse pathologique et du microenvironnement immunitaire intra-tumoral chez les patients atteints d'un cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules, traités par chimiothérapie néoadjuvante	133
Introduction	133
Patients et méthodes	135
Résultats	139
Discussion	151
Conclusion.....	152
DISCUSSION GENERALE	153
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	164
REFERENCES.....	166
ANNEXES	Erreur ! Signet non défini.

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition du taux de mortalité des principaux cancers en fonction du sexe.....	20
Figure 2 : Photos de lames colorées à l'HES des principaux carcinomes pulmonaires non a petites cellules	28
Figure 3 : Représentation des différentes catégories d'infiltration pleurale tumorale	32
Figure 4 : Schéma représentatif des aires ganglionnaires	34
Figure 5 : Courbes de survie globale en fonction du stade TNM	35
Figure 6 : Photos de lames colorées à l'HES des différents types architecturaux d'adénocarcinome pulmonaire selon la classification IASLC/ATS/ERS 2011	39
Figure 7 : Algorithme diagnostique pour les prélèvements de petite taille.....	43
Figure 8 : Les récepteurs de la famille HER/ErbB et ses ligands	48
Figure 9 : Localisation des différentes mutations <i>EGFR</i> et leur valeur prédictive de réponse aux thérapies ciblées.....	51
Figure 10 : Schéma de la translocation <i>EML4-ALK</i>	57
Figure 11 : Représentation schématique des différents variants <i>EML4-ALK</i> dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules	57
Figure 12 : Représentation des différents types de signaux avec l'utilisation des sondes break apart <i>ALK</i>	59
Figure 13 : Photos de techniques FISH étudiant le gène <i>ALK</i>	59
Figure 14 : Photos de marquage immunohistochimique avec les anticorps anti- <i>ALK</i>	60
Figure 15 : Représentation des différents mécanismes de résistance secondaire aux ITK anti- <i>EGFR</i>	66
Figure 16 : Représentation des 3 phases de la réponse immunitaire anti-tumorale	78
Figure 17 : Schéma représentatif des six caractéristiques des cellules tumorales	79
Figure 18 : Schéma représentant la mise à jour des piliers du cancer.....	79
Figure 19 : Les différentes cellules du microenvironnement tumoral	80
Figure 20 : Coupe HES d'un adénocarcinome pulmonaire riche en structures lymphoïdes tertiaires.....	82
Figure 21 : Coupe immunohistochimique d'une structure lymphoïde tertiaire	82
Figure 22 : Méta-analyse de l'association entre l'infiltrat immunitaire et le pronostic des patients atteints de cancer.....	84
Figure 23 : Courbe de Kaplan–Meier de la survie globale des adénocarcinomes pulmonaires de tous stades, selon le grade histologique (log-rank test).....	99
Figure 24 : Courbe de Kaplan–Meier de la survie globale des adénocarcinomes pulmonaires de stade I, selon le grade histologique (log-rank test).....	99
Figure 25 : Photo d'une lame HES utilisée pour la macrodissection.....	105
Figure 26 : Illustration des différents aspects moléculaires de la mutation DEL19 d' <i>EGFR</i> selon le sous-type architectural d'un adénocarcinome.....	111
Figure 27 : Photos d'immunomarquage mettant en évidence les cellules CD8+ et les cellules dendritiques matures DC-LAMP+ dans un adénocarcinome pulmonaire.	123
Figure 28 : Box plot représentant la distribution des densités des cellules dendritiques matures et des lymphocytes CD8+ en fonction du statut mutationnel <i>KRAS</i> et <i>EGFR</i>	125

Figure 29 : Courbe de Kaplan–Meier de la survie globale des adénocarcinomes selon la densité en cellules dendritiques matures et la densité en cellules CD8+ (log-rank test)	129
Figure 30 : Courbe de Kaplan–Meier de la survie globale des adénocarcinomes en fonction du statut <i>KRAS</i> et selon la densité en cellules dendritiques matures et la densité en cellules CD8+ (log-rank test)	130
Figure 31 : Aspect histologique de tumeurs pulmonaires chez des patients traités par chimiothérapie néoadjuvante.....	141
Figure 32 : Aspect histologique représentatif des 3 types de réponses pathologiques après chimiothérapie néoadjuvante.....	141
Figure 33 : Courbes de Kaplan-Meier de la survie globale, survie spécifique et survie sans récurrence en fonction du pourcentage de cellules tumorales viables résiduelles	142
Figure 34 : Courbe de Kaplan-Meier de la survie globale en fonction du pourcentage de cellules tumorales viables.....	143
Figure 35 : Coupes HES et immunohistochimiques de structures lymphoïdes tertiaires dans des tumeurs traitées par chimiothérapie néoadjuvante.....	144
Figure 36 : Analyse de la densité des LT CD8+ et des cellules dendritiques matures en fonction du traitement ou non par chimiothérapie néoadjuvante.	144
Figure 37 : Densités des cellules dendritiques matures et des lymphocytes CD8+ selon le pourcentage de cellules tumorales viables	145
Figure 38 : Courbes de Kaplan-Meier de la survie globale, spécifique et sans récurrence selon la densité des LT CD8+ et des CD matures DC-LAMP+.....	146
Figure 39 : Courbes de Kaplan-Meier de la survie globale, spécifique et sans récurrence en fonction de l'index immunitaire (analyse combinée de la densité de LT CD8+ et des CD matures DC-LAMP+).....	148

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Septième édition de la classification TNM 2009 des tumeurs pulmonaires	33
Tableau 2 : Stade TNM 2009	35
Tableau 3 : Classification IASLC/ATS/ERS 2011 des adénocarcinomes pulmonaires	41
Tableau 4 : Correspondance de la classification OMS 2004 avec la classification IASLC/ATS/ERS 2011	41
Tableau 5 : Principales thérapies ciblées utilisées dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules.	46
Tableau 6 : Comparaison des différentes techniques de mise en évidence des réarrangements du gène <i>ALK</i>	61
Tableau 7 : Association des altérations moléculaires avec le type d'architecture prédominante des adénocarcinomes	62
Tableau 8: Caractéristiques cliniques et pathologiques des patients atteints d'un adénocarcinome pulmonaire en fonction du grade histologique.....	91
Tableau 9 : Caractéristiques cliniques et pathologiques des patients atteints d'un adénocarcinome pulmonaire de stade I en fonction du grade histologique	92
Tableau 10 : Sous-stratification des adénocarcinomes tubulaires en fonction des atypies nucléaires, du compte mitotique et des secteurs cribriformes.....	93
Tableau 11 : Caractéristiques cliniques et pathologiques des tumeurs <i>KRAS</i> et <i>EGFR</i> mutées	95
Tableau 12 : Analyse univariée de la survie globale.....	97
Tableau 13 : Analyse multivariée de la survie globale	98
Tableau 14 : Analyses univariée et multivariée de la survie globale chez les patients de stade I	98
Tableau 15 : Caractéristiques cliniques des 40 patients possédant un adénocarcinome <i>EGFR</i> muté.....	104
Tableau 16 : Analyse de la distribution des mutations <i>EGFR</i> dans 153 fragments provenant de 40 patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire <i>EGFR</i> muté.....	108
Tableau 17 : Génotypage multisite des mutations <i>EGFR</i> et <i>KRAS</i> dans 39 fragments provenant de 10 patients connus pour avoir une tumeur WT	109
Tableau 18 : Analyse de la distribution du nombre de copie du gène <i>EGFR</i> dans 153 fragments provenant de 40 patients.....	112
Tableau 19 : Schéma de la revue de la littérature concernant la distribution des mutations <i>EGFR</i>	114
Tableau 20 : Caractéristiques cliniques, pathologiques et moléculaires des patients atteints d'un adénocarcinome pulmonaire en fonction de la densité en cellules dendritiques matures DC-Lamp+	126
Tableau 21 : Caractéristiques cliniques, pathologiques et moléculaires des patients atteints d'un adénocarcinome pulmonaire en fonction de la densité en lymphocytes CD8+	127
Tableau 22 : Analyse multivariée de la survie globale	129
Tableau 23 : Caractéristiques des 122 patients porteurs d'un carcinome non à petites cellules de stade III-N2 traités par chimiothérapie néoadjuvante	137

Tableau 24 : Caractéristiques des 39 patients porteurs d'un carcinome non à petites cellules de stade III-N2 non traités par chimiothérapie néoadjuvante	138
Tableau 25 : Analyse univariée de la survie globale en fonction des paramètres cliniques et immunitaires.....	147
Tableau 26 : Analyse multivariée de la survie globale, spécifique et sans récurrence selon les critères cliniques, pathologiques et immunitaires.	149
Tableau 27 : Nombre de patients survivants à 24, 36, 60 et 96 mois en fonction du pourcentage de cellules tumorales viables et de l'index immunitaire.....	150

RESUME

Il est maintenant bien établi que le système immunitaire joue un rôle majeur dans le contrôle des tumeurs, y compris dans les carcinomes pulmonaires. Cependant, les interactions entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral sont mal connues. Dans ce travail, nous avons étudié les caractéristiques morphologiques et moléculaires des cellules tumorales provenant d'adénocarcinomes pulmonaires et leur association avec la composition du microenvironnement immunitaire. Nous avons rapporté la valeur pronostique des paramètres morphologiques de ces tumeurs, comme le grade histologique des adénocarcinomes, et leur association avec le statut moléculaire *EGFR* et *KRAS*.

Nous avons émis l'hypothèse que la diversité morphologique et moléculaire de ces tumeurs pouvait être associée à une signature immunitaire intra-tumorale spécifique et que cela pourrait avoir un impact pronostique. Nous avons mis en évidence que la densité des cellules dendritiques matures, situées au sein de structures lymphoïdes tertiaires, variait en fonction du statut moléculaire *EGFR* et *KRAS* des tumeurs. De même, l'impact pronostique des cellules dendritiques matures et des lymphocytes CD8⁺ variait en fonction du statut moléculaire des tumeurs.

Nous avons également retrouvé la valeur pronostique de l'environnement immunitaire, représenté par la densité en cellules dendritiques matures et en lymphocytes CD8⁺, sur la survie à long terme des carcinomes pulmonaires de stade III-N2 opérés après chimiothérapie néoadjuvante. Enfin, nous avons démontré que la chimiothérapie n'est pas associée à de profondes modifications de l'infiltrat immunitaire, alors qu'elle entraîne des modifications des cellules tumorales.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'infiltrat immunitaire est intimement lié à la cellule tumorale et que la composition du microenvironnement immunitaire varie avec les caractéristiques de la tumeur. Cette interaction entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires contribue au pronostic de ces tumeurs. Ces données démontrent l'intérêt d'utiliser des traitements combinant des drogues cytotoxiques, telle la chimiothérapie conventionnelle, à des traitements immunomodulateurs permettant de favoriser une réponse immunitaire anti-tumorale efficace.

Mots-clefs : carcinomes pulmonaires non à petites cellules ; classification IASLC/ATS/ERS ; TNM 2009 ; *EGFR* ; *KRAS* ; immunité anti-tumorale ; lymphocytes T ; cellules dendritiques matures ; chimiothérapie néoadjuvante.

ABSTRACT

The major role of the immune system against tumor development is now clearly established, including lung carcinoma. Nevertheless, interaction between tumoral cells and immune environment is less well-defined. In that study, we have studied morphological and molecular tumoral cells characteristics from lung adenocarcinoma and their role in the composition of immune environment. We reported the prognostic value of morphological parameters, as histological grade of adenocarcinoma, and their association with molecular *EGFR* and *KRAS* status.

We hypothesized that morphological and molecular diversity of these tumors could be associated with a specific intratumoral immune signature, and could have an impact in prognosis. We showed that mature dendritic cells density, located in tertiary lymphoid structures, differed according to *EGFR* and *KRAS* status. Moreover, molecular status of tumors modified the prognostic value of mature dendritic cells and CD8+ T cells.

We found a prognostic value of immune environment, represented by dendritic cells and T CD8+ cells, in operated stage III-N2 lung carcinomas treated by neoadjuvant chemotherapy. At last, we demonstrated that chemotherapy is not associated with wide modifications in immune infiltrate, whereas it induced modifications in tumoral cells.

All together, these data strongly argue for a close link between tumoral cells and immune environment, which seems to depend on tumoral cell characteristics. This interaction between tumoral cells and immune cells contribute to the prognosis of these tumors. These results show the evidence that combine cytotoxic treatment, like conventional chemotherapy, with immunomodulators, favour a protective anti-tumor immune response.

Key words: non small cell lung carcinoma, IASLC/ATS/ERS classification, TNM stage, EGFR, KRAS, anti-tumor immunity; T cells; dendritic cells; neoadjuvant chemotherapy.

ABBREVIATIONS

ADC: adénocarcinome

AIM: adénocarcinome avec invasion minimale

AIS: adénocarcinome *in situ*

ALK: anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase

ATS: American Thoracic Society

BAC: bronchioloalveolar carcinoma

BPCO: broncho-pneumopathie chronique obstructive

CBPNPC: carcinome broncho-pulmonaire non à petites cellules

CD: cellule dendritique

CE: carcinome épidermoïde

CIRC: centre international de recherche sur le cancer

CMH: complexe moléculaire d'histocompatibilité

CN: nombre de copie d'un gène (copy number)

CPA: cellule présentatrice d'antigène

CPC: carcinome broncho-pulmonaire à petites cellules

Ct: cycle threshold

DC-LAMP: dendritic cell-lysosomal associated membrane protein

DFS: disease free survival (survie sans récurrence)

DSS: disease specific survival (survie spécifique)

EGFR: epidermal growth factor receptor

ERS: European Respiratory Society

FISH: fluorescence *in situ* hybridation

FOXP3: forkhead box P3

HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2

HES: hématoxyline-éosine-safran

IARC: International agency for research on cancer

IASLC: International Association for the Study of Lung Cancer

IFN: interféron

IL: interleukine

Inserm: Institut national de la santé et de la recherche médicale

INCa: Institut national du cancer

InVS: Institut de veille sanitaire

ITK: inhibiteur de tyrosine kinase
KRAS: kirsten Rat Sarcoma virus
LB: lymphocyte B
LT: lymphocyte T
NA: non applicable
ND: non déterminé
NK: natural killer
NS: non significatif
OMS: organisation mondiale de la santé (ou WHO)
OS: overall survival (survie globale)
PA: paquets-années
RECIST: response evaluation criteria in solid tumors
RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction
SLT: structure lymphoïde tertiaire (ou TLS)
TCR: T-cell receptor
TGF β : tumor-growth factor β
Th1: T helper de type 1
Th2: T helper de type 2
Th17: T helper de type 17
Ti-BALT: tumor-induced bronchus associated lymphoid tissue
TNF α : tumor necrosis factor α
Treg: T régulateurs
TTF1: thyroid transcription factor 1
VEGF : Vascular endothelial growth factor

INTRODUCTION

Le cancer du poumon est responsable de la plus grande mortalité par cancer. Malgré d'importantes avancées, tant dans le domaine de la prise en charge thérapeutique que dans la compréhension des mécanismes moléculaires de la carcinogénèse, la survie reste médiocre. La prise en charge thérapeutique a notamment été améliorée par l'apparition des thérapies ciblées, qui ont été développées grâce à la mise en évidence d'altérations moléculaires au sein des tumeurs pulmonaires. Le rôle bénéfique du système immunitaire dans le contrôle des tumeurs, y compris dans les carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules, est maintenant largement établi. En revanche, l'interaction entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires est encore peu connue. Mon travail de thèse s'inscrit directement dans mon travail quotidien concernant le diagnostic et la détermination des facteurs pronostiques des cancers pulmonaires. Dans ce travail, nous avons cherché à comprendre les interactions des cellules tumorales avec les cellules immunitaires en corrélant certaines caractéristiques des cellules tumorales, comme les anomalies moléculaires des carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBPNPC) avec la présence de certaines cellules du microenvironnement immunitaire.

Ce travail comporte plusieurs parties : la première partie concerne la caractérisation des carcinomes pulmonaires non traités par chimiothérapie néoadjuvante, d'un point de vue histologique avec l'évaluation de critères pathologiques pronostiques et d'un point de vue moléculaire. La deuxième partie s'intéresse plus spécialement aux altérations du gène *EGFR*, avec l'étude de la distribution des mutations et du nombre de copies de ce gène au sein des tumeurs et de leurs métastases thoraciques. La troisième partie démontre l'association de certaines caractéristiques des cellules tumorales avec le type d'infiltrat immunitaire et son influence sur le pronostic. Enfin, la quatrième partie concerne la valeur pronostique de l'infiltrat immunitaire et de la réponse pathologique évaluée après chimiothérapie néoadjuvante dans les CBPNPC.

Au préalable, nous allons résumer l'état des connaissances de la cancérogénèse pulmonaire et le rôle du système immunitaire durant le développement d'un cancer.

1) Epidémiologie

En 2012, le nombre de nouveaux cas de cancers en France a été estimé à 355 000 dont 200 000 chez l'homme et 155 000 chez la femme. Chez l'homme, les trois cancers les plus fréquents sont ceux de la prostate (56 841 cas), du poumon (28 211 cas) et du côlon-rectum (23 266) pour les tumeurs solides. Chez la femme, il s'agit des cancers du sein (48 763 cas), du côlon-rectum (18 926 cas) et du poumon (11 284 cas). Le nombre de décès par cancer en 2012 est estimé à 148 000 décès dont 85 000 chez l'homme et 63 000 chez la femme. Le cancer du poumon est la première cause de décès par cancer chez l'homme (21 326 décès) devant le cancer colorectal (9 275 décès) et le cancer de la prostate (8 876 décès). Chez la femme, le cancer du sein (11 886 décès) se situe au 1er rang devant le cancer du poumon (8 623 décès) qui arrive désormais en deuxième position devant le cancer colorectal (8 447 décès) (Figure 1).

Si l'on considère tous les cancers de façon confondue, l'incidence augmente alors que la mortalité diminue. Des disparités hommes/femmes sont présentes en termes d'évolution d'incidence et de mortalité, en particulier pour le cancer du poumon dont l'incidence et la mortalité augmentent de manière importante chez la femme (données INCa du rapport 2013, <http://www.e-cancer.fr/>).

Pour ce qui concerne le cancer du poumon, il se situe au 4e rang des cancers, tous sexes confondus. On comptait 39 495 nouveaux cas en 2012 dont 71 % survenant chez l'homme. L'âge moyen au diagnostic est de 66 ans chez l'homme et 65 ans chez la femme. Avec environ 29 949 décès estimés en 2012 (dont 72 % chez l'homme), le cancer du poumon constitue, tous sexes confondus, la première cause de décès par cancer en France, loin devant le cancer colorectal (17 722 décès) et le cancer du sein (11 886 décès). Il représente 20,1 % de l'ensemble des décès par cancer. Chez la femme, il est en progression constante, son incidence a triplé ces 20 dernières années.

Malgré les avancées thérapeutiques, son pronostic reste sombre avec une survie à 5 ans uniquement de 14 %. Ce mauvais pronostic est lié au diagnostic à un stade tardif de la majorité des patients, ne permettant pas de traitement chirurgical curatif. En effet, plus de 70% des patients présentant un cancer pulmonaire sont diagnostiqués à un stade avancé, essentiellement car les symptômes n'apparaissent que tardivement (Herbst *et al.*, 2008). Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode reconnue pour le dépistage du cancer bronchique. Aux Etats Unis, le scanner faible dose est en cours d'évaluation comme moyen de dépistage

(Church *et al.*, 2013). Cependant, la meilleure arme pour lutter contre le développement du cancer des poumons reste la prévention, en agissant en particulier contre le tabagisme.

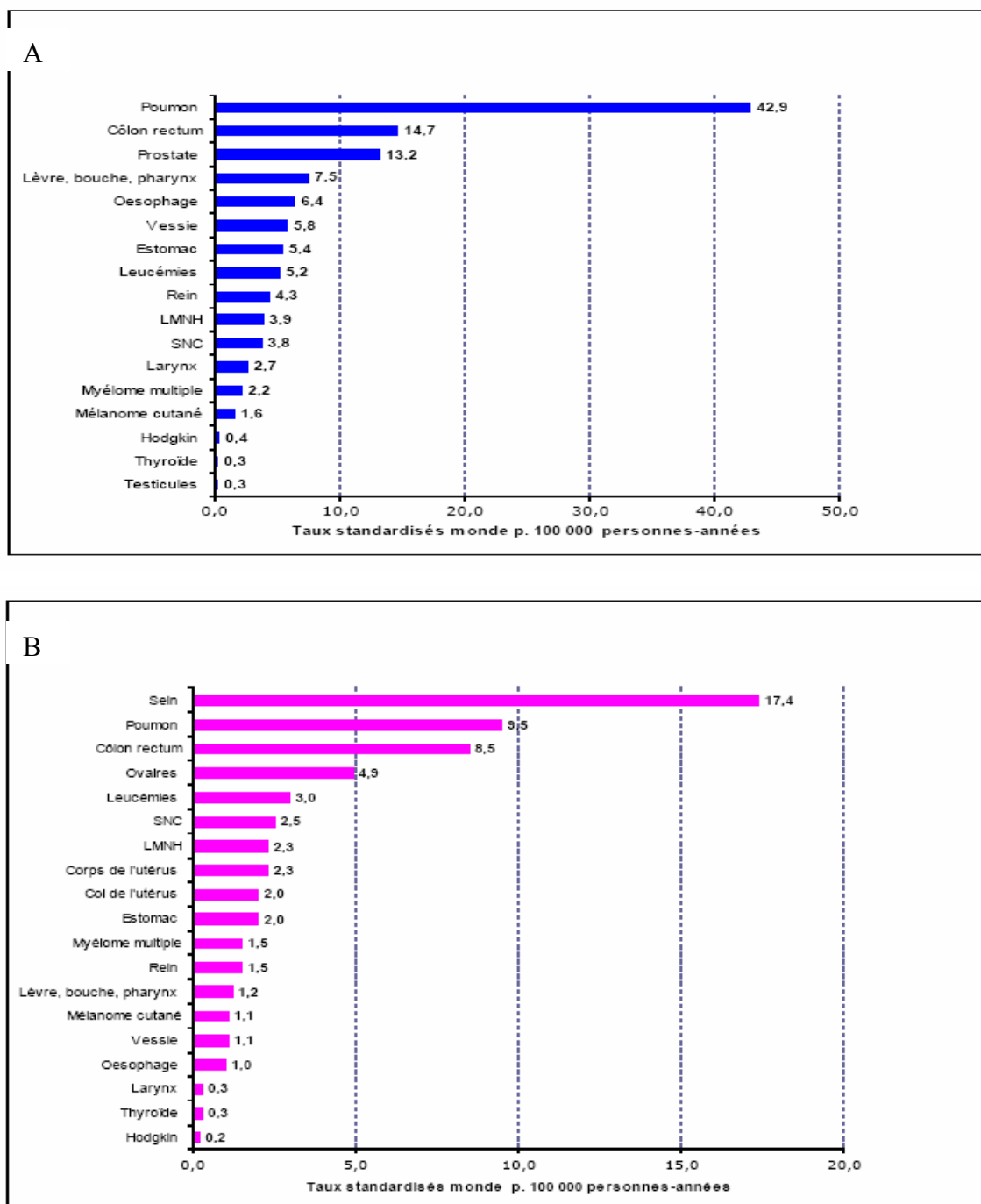


FIGURE 1 : REPARTITION DU TAUX DE MORTALITE DES PRINCIPAUX CANCERS EN FONCTION DU SEXE

A : Taux de mortalité observé dans le monde chez l'homme pour la période 2003-2007 ; B : Taux de mortalité observé dans le monde chez la femme pour la période 2003-2007 (données INVS, CEPIDC, INSERM).

2) Les facteurs de risque

2.1. Le tabac

Le tabac constitue la principale cause de décès liée au cancer dans le monde et en France. Il tue près de 6 millions de personnes chaque année dans le monde (données OMS 2011) dont 600 000 par tabagisme passif (Oberg *et al.*, 2011). Un cancer sur trois est lié au tabac car la fumée du tabac contient plus de 4 000 substances chimiques dont au moins 50 sont cancérogènes (Stämpfli and Anderson, 2009). Le tabac est le principal facteur de risque du cancer pulmonaire, en effet le tabagisme actif est responsable de 80% des cancers bronchiques. Les fumeurs ont 20 fois plus de risque de développer un cancer du poumon par rapport aux non-fumeurs (Le Faou *et al.*, 2005). Le tabac est aussi un facteur de risque reconnu pour d'autres types de cancers : cavité buccale, pharynx, larynx, pancréas, vessie, rein, cavité nasale, sinus, œsophage, estomac, foie, col de l'utérus, colorectal, ovaire de type carcinome mucineux, sein et la leucémie myéloïde chronique (Secretan *et al.*, 2009) (Gandini *et al.*, 2008).

Le risque de cancer augmente notamment en fonction de la quantité de tabac fumé (dose de tabac) ainsi que de l'ancienneté du tabagisme (durée). Le nombre de paquets-années est un moyen d'évaluer cette consommation tabagique, il se calcule en multipliant le nombre de paquets de cigarettes fumées par jour par le nombre d'années, mais d'autres facteurs sont importants notamment l'âge de début du tabagisme. Le tabac est toujours nocif, il n'existe pas de seuil en dessous duquel le tabac n'est pas cancérogène (Wirth *et al.*, 2009). Un bénéfice significatif de l'arrêt du tabac, augmentant avec la durée de l'abstinence, a été observé pour tous les cancers associés au tabagisme. On observe un gain d'espérance de vie de 3 ans chez un fumeur s'arrêtant à 60 ans, ce gain atteint 6 ans si l'arrêt a lieu à l'âge de 50 ans, 9 ans à 40 ans et serait proche de celui des non-fumeurs avant 35 ans (Doll *et al.*, 2004). Néanmoins, les anciens fumeurs conservent un risque plus élevé de cancer du poumon comparé aux personnes du même âge n'ayant jamais fumé, même après une longue période d'abstinence. Enfin, l'arrêt du tabac après un cancer du poumon améliore le pronostic de survie à 5 ans et diminue le risque de récurrence et le risque de développer un second cancer (Parsons *et al.*, 2010).

Le tabagisme passif est également un facteur de risque. Il est lié à l'inhalation de manière involontaire de la fumée dégagée par un fumeur. Il a été démontré qu'une personne en situation de tabagisme passif voit son risque de développer un cancer du poumon augmenté de 26% par rapport à un non-fumeur (Couraud *et al.*, 2012). Le courant de fumée qui s'échappe

de la cigarette d'un fumeur vers une autre personne est appelé courant secondaire. La fumée constituant ce courant secondaire est constitué de particules plus fines qui pénètrent plus profondément dans le poumon.

2.2. Le Radon

Le radon représente le second facteur de risque de cancer du poumon après le tabac (Samet *et al.*, 2009). Le radon est un gaz radioactif incolore et inodore, naturellement présent dans l'environnement. Il est libéré dans l'air lors de la désintégration naturelle de l'uranium dans le sol et la pierre et pénètre dans l'organisme principalement avec l'air inhalé. Il est particulièrement présent dans les régions riches en granite, en uranium ou encore volcaniques (par exemple le Massif-Central, la Bretagne, les Vosges, la Corse). Le radon a été classé cancérigène pulmonaire pour l'homme par le CIRC en 1987 et par l'IARC en 1988. Il lui est attribué annuellement en France entre 1 234 et 2 913 décès par cancer du poumon soit entre 5 % et 10 % des décès pour cette pathologie (Catelinois *et al.*, 2006).

2.3. L'exposition professionnelle

L'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) estime que 15% des cas de cancers du poumon seraient d'origine professionnelle.

L'amiante est de loin le facteur de risque le plus fréquent pour les cancers broncho-pulmonaires d'origine professionnelle. L'amiante désigne un ensemble de silicates à texture fibreuse résistants au feu et pour cela utilisé dans de nombreux calorifugeages. Bien que les dangers de l'amiante aient été identifiés dès 1906 avec les premiers cas de fibrose pulmonaire, et que le CIRC l'ait classé cancérigène en 1973, il faudra attendre 1997 (décret no 96-1133 du 24 décembre 1996) pour que la France interdise son utilisation. Cependant, elle reste encore aujourd'hui présente dans de nombreux bâtiments et équipements. Les maladies liées à l'amiante représentent actuellement la deuxième cause de maladies professionnelles et la première cause de décès liée au travail (hors accidents du travail). L'amiante est connue pour induire, outre les cancers pulmonaires, les mésothéliomes.

Il existe d'autres substances cancérigènes d'origine professionnelle, que l'amiante, favorisant le cancer du poumon, elles sont inscrites sur les tableaux des maladies professionnelles :

- les rayonnements ionisants,
- l'acide chromique et les chromates,
- les goudrons de houille, les huiles de houilles et les suies de combustion du charbon,
- l'inhalation de poussières ou de vapeurs arsenicales,
- l'inhalation de poussières ou de vapeurs renfermant des arseno pyrites aurifères,
- l'inhalation de poussières d'amiante,
- les opérations de grillage de mattes à nickel,
- le travail dans les mines de fer,
- l'inhalation de poussières ou fumées renfermant du cadmium,
- l'inhalation de poussières de cobalt associées au carbure de tungstène,
- le bis (chlorméthyl) éther

D'autres substances peuvent provoquer un cancer pulmonaire comme le béryllium, le cadmium, la silice et les gaz d'échappement de moteurs diesel. Mais ces substances ne sont pas encore reconnues par les régimes d'assurances maladie comme pouvant être à l'origine de maladies professionnelles.

2.4. La pollution atmosphérique

L'expertise collective de l'Inserm (Institut national de la santé et de la recherche médicale) et de l'Afsset (Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail) rendue publique en octobre 2008, a démontré que la pollution atmosphérique, d'origine automobile et industrielle, est un facteur, certes mineur comparé au tabac, mais qui pourrait favoriser le cancer pulmonaire. Cette pollution est due à des gaz, comme le dioxyde de soufre (SO₂), le dioxyde d'azote (NO₂), l'ozone (O₃) et les fumées de diesel (Trédaniel *et al.*, 2009). Il s'agit néanmoins de données préliminaires qui doivent être vérifiées.

2.5. Le cannabis

Il est difficile d'établir un lien entre le cancer pulmonaire et le cannabis puisque la collecte d'information sur les drogues illégales souffre de nombreux biais. Par ailleurs, beaucoup de fumeurs de cannabis consomment également du tabac et il est donc difficile de savoir quelle est l'implication exacte de l'une ou de l'autre de ces substances. Le cannabis est considéré

comme un facteur de risque probable de cancers pulmonaires car il contient les substances cancérigènes du tabac et plus de goudron que le celui-ci.

2.6. Les antécédents personnels et familiaux :

Les antécédents personnels d'affections respiratoires sont également un facteur de risque de cancer du poumon, en particulier les personnes atteintes de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), de silicose, de béryllose et de tuberculose.

De même, les personnes qui ont déjà été atteintes d'un cancer pulmonaire ont davantage de risque de développer un deuxième cancer pulmonaire que la population générale.

Par ailleurs, un cas de cancer pulmonaire familial augmente également le risque de survenue de ce cancer (Li *et al.*, 2008).

L'existence de facteurs génétiques protecteurs est fortement probable et pourrait expliquer qu'un grand nombre de fumeurs (plus de 80%) ne développent pas de cancers pulmonaires car ils ont la capacité de mieux métaboliser les constituants cancérigènes contenus dans la fumée de cigarette. Au contraire, il existe également des facteurs de susceptibilité génétique favorisant ce cancer. Certains polymorphismes de gènes sont connus pour être associés à un risque accru de cancer du poumon. C'est le cas des gènes codant pour les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$ et $\beta 4$ des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine, pour lesquels certains polymorphismes nucléotidiques sont fortement liés à la dépendance tabagique et au cancer pulmonaire (Amos *et al.*, 2008) ; et pour le gène *TERT* qui code pour la télomérase reverse transcriptase (McKay *et al.*, 2008). Cependant les mécanismes par lesquels ces polymorphismes sont associés aux cancers ne sont pas connus. De plus, Bell *et al.* ont décrit la présence d'une mutation germinale p.T790M du gène *EGFR* dans une famille présentant de multiples cas d'adénocarcinome de type bronchioloalvéolaire (Bell *et al.*, 2005). Cette mutation était déjà connue comme mutation somatique, c'est-à-dire uniquement présente dans les cellules tumorales. La présence de cette mutation est associée à une résistance au traitement par anti-EGFR. Plus récemment, une mutation germinale sur l'exon 21 du gène *EGFR* (p.V843I) a également été décrite (Ikeda *et al.*, 2008).

2.7. Les hormones sexuelles

La prédominance des cancers du poumon chez les femmes parmi les non-fumeurs suggère un rôle hormonal. Les récepteurs aux œstrogènes sont souvent exprimés dans les tumeurs pulmonaires, particulièrement chez les femmes non tabagiques. Une étude américaine récente

portant sur 180 000 femmes a retrouvé une réduction du risque de cancer du poumon chez les femmes avec puberté tardive et ménopause précoce (Brinton *et al.*, 2011).

2.8. Les habitudes alimentaires

Des études essentiellement sur la population chinoise ont démontrées que l'inhalation de vapeur d'huile chaude ou de particules de charbon augmenteraient le risque de cancer du poumon (Li *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010).

3) Les différents types histologiques de tumeurs pulmonaires

Le poumon peut être le siège de tumeurs bénignes ou malignes. Les tumeurs bénignes sont rares et ne représentent que 5 à 10 % des tumeurs pulmonaires, elles sont essentiellement constituées par les papillomes et les adénomes (Travis WD *et al.*, 2004).

Parmi les tumeurs malignes, ils existent des tumeurs primitives et des tumeurs secondaires (ou métastases). D'après la classification OMS 2004, les tumeurs malignes primitives du poumon se répartissent en deux familles principales : les carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBPNPC) représentant environ 80-85% des carcinomes pulmonaires et les carcinomes bronchiques à petites cellules (CPC), représentant 15 % (Travis WD *et al.*, 2004). Les autres types de tumeurs malignes primitives du poumon sont très rares et comprennent les tumeurs de type glandes salivaires, les sarcomes et les lymphomes. Le développement embryologique pulmonaire explique en partie les différents types histologiques des carcinomes pulmonaires. En effet, le développement de l'arbre bronchique donnant naissance aux cellules épithéliales bronchiques ciliées, mucosécrétantes et neuroendocrines, précède celui des sacs alvéolaires comportant les pneumocytes. Ces différentes cellules sont à l'origine des adénocarcinomes, développés à partir des pneumocytes, des carcinomes épidermoïdes provenant des cellules bronchiques en métaplasie malpighienne et des tumeurs neuro-endocrines. Les CBPNPC comprennent les adénocarcinomes qui représentent 50% des CBPNPC, les carcinomes épidermoïdes (35%) et les carcinomes à grandes cellules (15%) (Figure 2).

3.1. Les carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules

Les adénocarcinomes

Ils représentent environ 50% de l'ensemble des CBPNPC. Il s'agit généralement de nodules périphériques, les localisations centrales sont rares. Leur incidence est en nette augmentation probablement à cause des habitudes tabagiques en évolution, notamment à cause des cigarettes light sur lesquelles les fumeurs « tirent » plus fortement, engendrant des lésions pulmonaires plus périphériques. Cependant, bien que la plupart des cas soient rencontrés chez les fumeurs, il s'agit du type histologique le plus fréquemment retrouvé chez les non-fumeurs et notamment chez la femme (Jemal *et al.*, 2011). Les adénocarcinomes sont des tumeurs d'origine glandulaire qui possèdent des architectures variées qui sont à la base de la classification histopronostique IASLC/ATS/ERS décrite en 2011 et qui sera développée plus loin.

Les carcinomes épidermoïdes

Ils représentent environ 30% de l'ensemble des CBPNPC. Ils se développent habituellement à partir des bronches situées dans la partie centrale du poumon. Le carcinome épidermoïde est fortement lié au tabac, plus de 90% des patients sont fumeurs.

Les carcinomes à grandes cellules

Ils représentent environ 15% des CBPNPC (Iyoda *et al.*, 2001). Leur incidence est en diminution au profit des adénocarcinomes (Travis *et al.*, 2013). Cette entité est hétérogène car elle comporte en plus des carcinomes à grandes cellules, les carcinomes neuro-endocrines à grandes cellules, les carcinomes basaloïdes et les carcinomes de type lymphoépithélial. La prochaine classification OMS devrait modifier ce groupe histologique car les carcinomes basaloïdes devrait intégrer les carcinomes épidermoïdes et les carcinomes neuro-endocrines à grandes cellules devraient rejoindre le groupe des tumeurs neuro-endocrine de haut grade avec les carcinomes à petites cellules.

Les carcinomes adénosquameux

Ces carcinomes sont rares, ils représentent moins de 5% des CBPNPC (Takamori *et al.*, 1991), ils sont constitués par deux contingents tumoraux, l'un glandulaire adénocarcinomateux, l'autre malpighien de type carcinome épidermoïde, chacun de ces constituant compte pour plus de 10 % de la surface tumorale.

Les carcinomes sarcomatoïdes

Ils sont rares, également moins de 5% des CBPNPC (Wick *et al.*, 1997), ils comprennent 5 sous-groupes : carcinomes pléomorphes, carcinomes à cellules fusiformes, carcinomes à cellules géantes, carcinosarcomes et blastomes pulmonaires.

Les tumeurs carcinoïdes

Ces tumeurs représente moins de 2% des CBPNPC (Travis *et al.*, 1998), ce sont des tumeurs de nature neuro-endocrine, elles sont divisées en tumeurs carcinoïdes typiques et atypiques. Le caractère atypique dépend de la présence de nécrose et d'un nombre de mitoses supérieur à 2 mitoses pour 2 mm². La prochaine classification OMS devrait intégrer ces tumeurs dans le groupe des tumeurs neuroendocrines de bas grade.

3.2. Les lésions préneoplasiques

Les lésions bronchiques préneoplasiques sont bien connues, elles vont de la dysplasie au carcinome *in situ*. La transformation des lésions préneoplasiques en adénocarcinome est moins bien connue car peu de biopsies de ces lésions ont été effectuées, essentiellement à cause de la résolution du scanner qui ne permettait pas jusqu'alors de les diagnostiquer. Néanmoins, les études moléculaires nous permettent de supposer que les hyperplasies pneumocytaires atypiques sont des lésions préneoplasiques et que les adénocarcinomes *in situ* (anciennement carcinomes bronchioloalvéolaires ou BAC) sont des lésions pré-invasives (Gazdar and Brambilla, 2010). Les lésions d'hyperplasie pneumocytaire atypique sont définies par l'OMS comme des proliférations de pneumocytes présentant des atypies cellulaires, dont la taille est inférieure à 5 mm.

3.3. Les métastases pulmonaires

En dehors des tumeurs pulmonaires primitives, le poumon peut être le siège de tumeurs secondaires ou métastatiques. Les métastases pulmonaires les plus fréquentes proviennent des cancers du sein, du côlon-rectum, de la prostate, du pancréas et du rein. L'étude immunohistochimique avec l'anticorps anti-TTF1 permet généralement de différencier les adénocarcinomes primitifs des métastases pulmonaires d'adénocarcinomes. L'antigène TTF1 (thyroïd transcription factor 1) est un facteur de transcription, d'où son marquage nucléaire en immunohistochimie, il est exprimé dans le poumon normal par les pneumocytes de type II et par les cellules épithéliales normales de la thyroïde. Il est impliqué dans le développement pulmonaire et la différenciation du poumon distal. Environ 90% des adénocarcinomes pulmonaires non mucineux l'expriment (Yatabe *et al.*, 2002) alors que les métastases ne l'expriment généralement pas sauf celles de la thyroïde.

Le poumon peut également être le siège d'envahissement par des tumeurs malignes primitives de la plèvre ou mésothéliomes. Les mésothéliomes sont constitués de plusieurs sous-types histologiques (épithélioïde, sarcomatoïde, desmoplasique et biphasique). Le sous-type

épithélioïde ressemble morphologiquement aux carcinomes, il se distingue des carcinomes pulmonaires primitifs par l'étude immunohistochimique. Dans les mésothéliomes, les cellules tumorales sont marquées par les anticorps anti-calrétinine et anti-WT1 alors qu'elles ne sont pas marquées par le TTF-1, l'ACE et le CD15, ce qui est l'inverse dans les adénocarcinomes pulmonaires. Un panel de 4 marqueurs au minimum doit être utilisé pour le diagnostic de mésothéliome, 2 marqueurs positifs pour le mésothéliome (par exemple : calrétinine, cytokératine 5/6, WT-1) et 2 marqueurs positifs pour les adénocarcinomes mais négatifs pour les mésothéliomes (par exemple : TTF1, ACE et CD15) (Husain *et al.*, 2009).

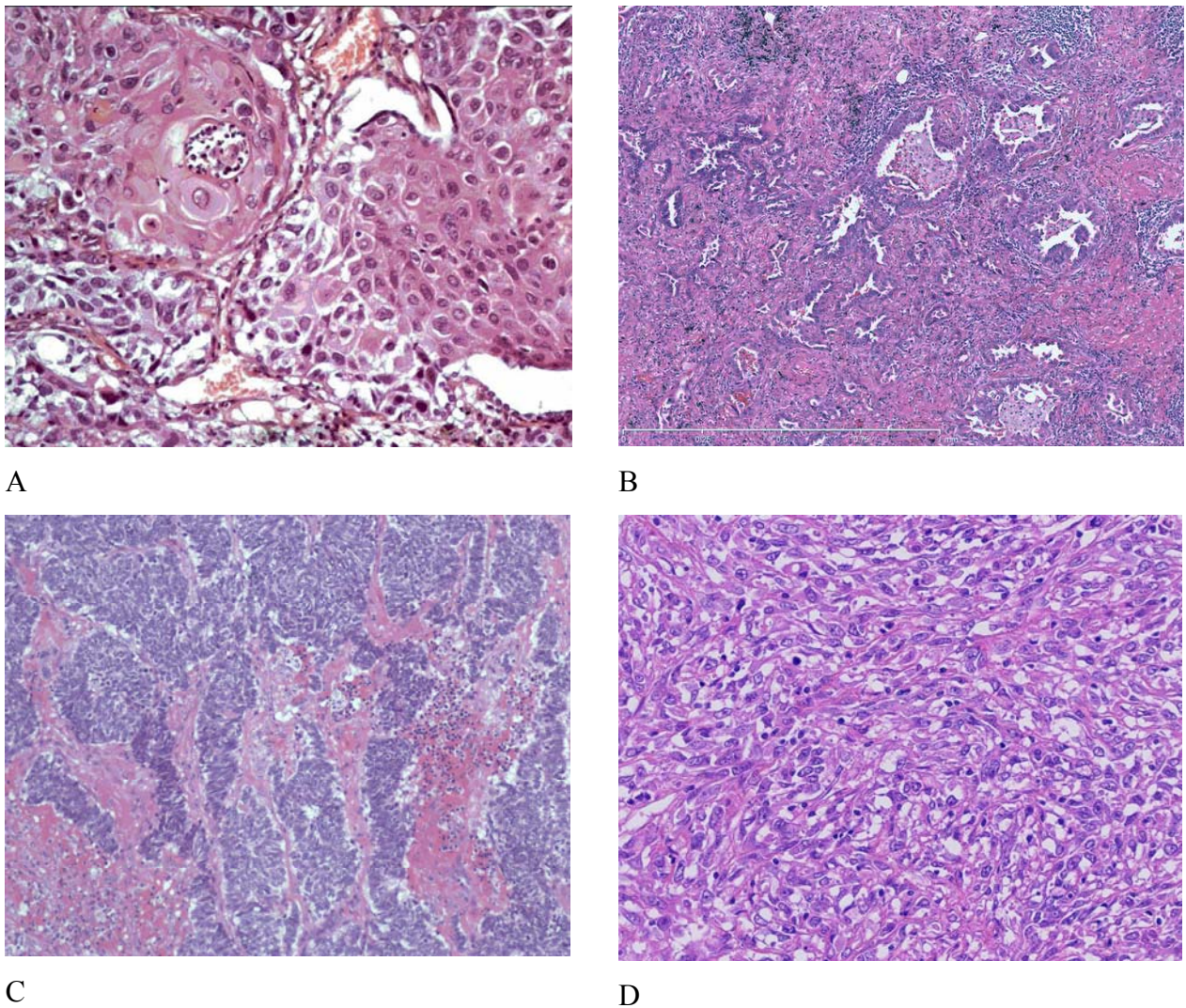


FIGURE 2 : PHOTOS DE LAMES COLOREES A L'HES DES PRINCIPAUX CARCINOMES PULMONAIRES NON A PETITES CELLULES

A : carcinome épidermoïde infiltrant, B : adénocarcinome infiltrant (à prédominance tubulaire), C : carcinome neuro-endocrine à grandes cellules, D : carcinome sarcomatoïde à cellules fusiformes.

4) Les facteurs pronostiques des carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules

4.1. Les facteurs cliniques et biologiques

Les principaux facteurs pronostiques cliniques indépendants sont le performance status, l'âge et le sexe. En effet, un bon indice de performance, selon l'échelle de Karnofsky, le sexe féminin et un âge inférieur à 60 ans sont des caractéristiques cliniques favorables indépendantes (Graziano, 1997; Takise *et al.*, 1988).

Parmi les critères biologiques, l'hypoalbuminémie (<3.5 g/dl) traduisant la dénutrition est un facteur de mauvais pronostic (Espinosa *et al.*, 1995). L'hypercoagulabilité (augmentation des D-dimères et thrombocytose) est corrélée à un mauvais pronostic dans les CBPNPC (Unsal *et al.*, 2004; Gonzalez Barcala *et al.*, 2010). De même, un taux élevé de CRP (Alifano *et al.*, 2011) et un taux de fibrinogène sérique élevé (Sheng *et al.*, 2013) sont également des marqueurs de mauvais pronostic.

4.2. Les facteurs histologiques

Les marqueurs histologiques sont les facteurs pronostiques les plus performants, ils regroupent la classification TNM récemment actualisée en 2009 et la nouvelle classification des adénocarcinomes pulmonaires décrite en 2011 par un regroupement d'experts internationaux de l'IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer), l'ATS (American Thoracic Society) et l'ERS (European Respiratory Society) (Travis *et al.*, 2011). Les embols tumoraux vasculaires sont également des marqueurs histologiques pronostiques (Strano *et al.*, 2013). La plupart des études montrent que la présence d'embols est associée à un mauvais pronostic, essentiellement chez les patients porteurs d'un CBPNPC de stade précoce (stades I et II). Certains auteurs suggèrent également d'intégrer la présence d'embols tumoraux dans la prochaine classification TNM voire de proposer systématiquement aux patients ayant une tumeur de stade I possédant des embols vasculaires une chimiothérapie adjuvante (Nentwich *et al.*, 2013; Maeda *et al.*, 2011; Kudo *et al.*, 2013; Harada *et al.*, 2011; Strano *et al.*, 2013).

4.2.1. La classification TNM 2009

La classification TNM est le facteur pronostique le plus puissant dans les cancers et en particulier dans les cancers du poumon. La dernière classification datant de 2009 (7^{ème} édition) est marquée par de profonds changements modifiant le T, le M et le stade. La nouvelle édition a été proposée par l'IASLC International Staging Project (Goldstraw *et al.*, 2007) puis acceptée par l'Union for International Cancer Control (UICC) et l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Sobin and Compton, 2010) (Tableau 1). Elle dérive de l'analyse de plus de 100 000 cas de cancer du poumon provenant de 19 pays dans le monde. Dans cette nouvelle édition, l'utilisation de cette classification pour les tumeurs carcinoïdes (typiques et atypiques) est validée.

La taille de la tumeur (T) : le seuil de 3 cm sépare le T1 du T2, le T1 et le T2 sont également séparés en deux catégories : 2 cm sépare le T1a du T1b, 5 cm sépare le T2a du T2b. Une taille supérieure à 7 cm devient T3. Il est recommandé de mesurer la taille de la tumeur sur un poumon non fixé (Travis, 2009).

Cette nouvelle classification relance la question du type d'intervention chirurgicale à proposer pour les tumeurs de petite taille sans envahissement ganglionnaire, en particulier les tumeurs classées pT1aN0 et pour les adénocarcinomes *in situ*. Deux études prospectives sont actuellement en cours pour évaluer la balance bénéfice/risque de la lobectomie versus la segmentectomie ou la résection atypique dans ce type de tumeur (études CALGB 140503 et JCOG0802/WJOG4607L). De même, l'étude European COSMOS montre que le curage ganglionnaire peut être évité dans les carcinomes pulmonaires de stade précoce, cliniquement N0 quand la taille pathologique (pT) n'excède pas 10mm ou lorsque le SUVmax est < 2.0 (Veronesi *et al.*, 2011).

L'extension ganglionnaire (N) : n'a pas été modifiée dans cette actuelle édition par rapport à la 6^{ème} édition. La description des différentes aires ganglionnaires est schématisée dans la Figure 4. Les recommandations sont l'exérèse complète d'au moins six aires ganglionnaires dont 3 médiastinales et 3 du groupe N1. Il a été démontré que, plus le nombre de ganglions réséqués était grand, meilleure était la survie (Wright *et al.*, 2006 ; Watanabe and Asamura, 2009), même si la tumeur était classée N0 (Gajra *et al.*, 2003). D'après l'étude de l'IASLC, trois groupes pronostiques de tumeurs avec métastases ganglionnaires ont été identifiés : celui de meilleur pronostic constitué par l'infiltration d'une seule aire N1 (48% de survie à 5 ans),

celui de plus mauvais pronostic constitué par l'infiltration de plusieurs aires N2 (20% de survie à 5 ans) et celui de pronostic intermédiaire constitué soit par l'infiltration d'une aire N2 ou de plusieurs aires N1 (35% de survie à 5 ans) (Rusch *et al.*, 2007). Les micrométastases ganglionnaires correspondent à une taille tumorale dans le ganglion entre 0,2 et 2 mm², elles sont classées pN1, 2 ou 3 (mi). Les métastases ganglionnaires sous forme de cellules isolées (<0,2mm²) sont classées pN0(i).

Les nodules multiples : lorsqu'un ou plusieurs nodules sont associés à la tumeur principale, deux hypothèses diagnostiques sont possibles, soit il s'agit d'une métastase pulmonaire de la tumeur principale (ou nodule satellite), soit il s'agit d'un deuxième cancer synchrones. Les aspects morphologiques, immunophénotypes et moléculaires, lorsqu'ils sont différents, peuvent permettre de porter le diagnostic de deuxième tumeur primitive. Cette distinction a une importance car les tumeurs primitives multiples synchrones doivent être classées, selon la TNM, séparément, alors que les nodules satellites modifient le T selon leur localisation par rapport à la tumeur principale. Lorsqu'il s'agit de 2 tumeurs primitives, on peut faire figurer les 2 stades ou bien, si un seul stade doit figurer, on précise le plus élevé et on y ajoute (m) pour multiple ou bien le nombre de tumeur entre parenthèse, par exemple pT3(m) ou pT3(4). Lorsqu'il s'agit de tumeurs définies comme métastatiques, le T ou le M dépendent de la localisation de la ou des métastases, pT3 : si elles sont dans le même lobe, pT4 : si elles sont dans 2 lobes séparés mais homolatéraux, pM1a : si elles sont bilatérales.

La présence de tumeurs multiples d'origine différente est donc défini par (Martini and Melamed, 1975) :

- Tumeurs métachrones de même morphologie, apparues > 2 ans après la 1ère tumeur, situées dans des lobes différents, sans métastase ganglionnaire et sans métastase systémique.
- Tumeurs synchrones de même morphologie, situées dans des segments ou lobes différents, sans métastase ganglionnaire N2 ou N3 et sans métastase systémique.
- Tumeurs de morphologie ou de caractéristique moléculaire différente.

L'invasion de la plèvre : dans la classification de 2009, le degré d'invasion de la plèvre est précisé et le T en dépend. Cette invasion est divisée en 4 catégories (Figure 3) :

PL0 : absence d'infiltration de la plèvre viscérale (pas de dépassement de la limitante élastique)

PL1 : invasion tumorale au-delà de la limitante élastique (pT2) mais sans dépassement de la surface mésothéliale

PL2 : envahissement de la surface pleurale (effraction du mésothélium)

PL3 : envahissement de la plèvre pariétale (pT3)

Lorsque la coloration standard (HES) ne permet pas à l'évidence de préciser le degré d'infiltration de la plèvre, les colorations des fibres élastiques comme la coloration de Miller facilite la précision du degré d'envahissement.

La présence de nodule de carcinose pleurale ou péricardique est classée pM1a, contrairement à pT4 dans l'ancienne édition.

Comme dans les autres TNM des autres organes, un préfixe permet de préciser par quel moyen le stade a été réalisé : c (stade déterminé par l'examen clinique et radiologique, ce préfixe c peut être absent car il est implicite en l'absence d'un autre préfixe), p (stade déterminé par l'examen anatomo-pathologique), y (stade évalué après un traitement néoadjuvant -chimiothérapie ou radiothérapie-). La description des stades en fonction de la classification TNM et le taux de survie en fonction des stades sont indiqués dans la Figure 5 et le Tableau 2. La prochaine révision est attendue pour 2016 et devrait prendre en compte les mésothéliomes et les tumeurs thymiques.

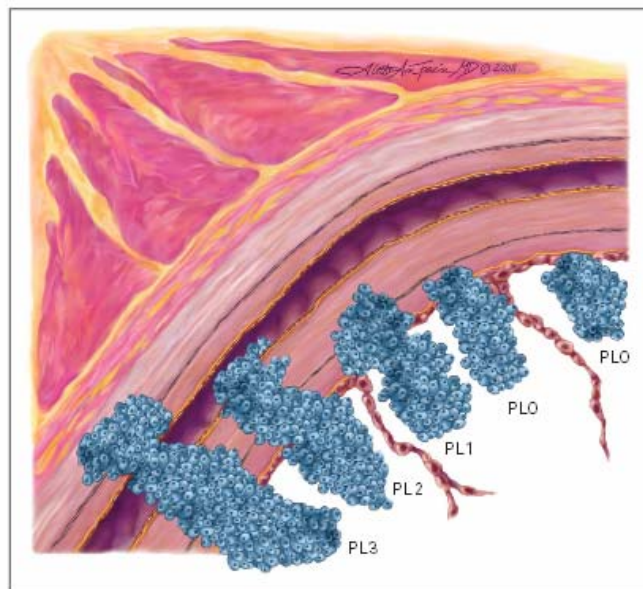


FIGURE 3 : REPRESENTATION DES DIFFERENTES CATEGORIES D'INFILTRATION PLEURALE TUMORALE

En bleu figurent les cellules tumorales. PL0: absence d'infiltration de la limitante élastique ; PL1: infiltration pleurale représentée par un dépassement de la limitante élastique (noir) ; PL2 : infiltration du revêtement pleural (orange) ; PL3 : infiltration de la plèvre pariétale classée pT3. Reproduction de Aletta Ann Frazier, d'après Rusch *et al.*, 2009.

T	
T0	Pas de tumeur
Tis	Carcinome <i>in situ</i>
Tx	Non déterminé
T1	Tumeur ≤ 3 cm de grand axe, sans infiltration pleurale, sans invasion de la bronche souche T1a : ≤ 2 cm T1b : > 2 cm mais ≤ 3 cm
T2	Tumeur > 3 cm et ≤ 7 cm de grand axe ; ou présentant une infiltration pleurale (PL1, PL2) ; ou atteignant la bronche souche à > 2 cm de la carène ; ou associée à une atélectasie ou une pneumopathie obstructive s'étendant à la région hilare sans atteindre le poumon complet. T2a : > 3 cm mais ≤ 5 cm T2b : > 5 cm mais ≤ 7 cm
T3	Tumeur > 7 cm ; ou toute tumeur envahissant la paroi thoracique, le diaphragme, le nerf phrénique, la plèvre médiastinale ou pariétale (PL3) ou le péricarde ; ou tumeur de la bronche souche à < 2 cm de la carène, ou associée à une atélectasie complète du poumon entier ; ou nodule(s) satellite(s) dans le même lobe
T4	Tumeur de toute taille envahissant une des structures suivantes : médiastin, cœur, gros vaisseaux, trachée, nerf récurrent laryngé, œsophage, corps vertébral, carène ; ou nodule(s) satellite(s) dans un autre lobe ipsilatéral
N	
Nx	Non déterminé
N0	Pas de métastase ganglionnaire
N1	Métastase(s) ipsilatérale(s) intra-pulmonaire, péri-bronchique ou hilare incluant les métastases par contiguïté
N2	Métastase(s) médiastinale(s) ipsilatérale(s)
N3	Métastase(s) médiastinale(s) ou hilare(s) controlatérale(s), ou sus-claviculaire
M	
Mx	Non déterminé
M0	Absence de métastase à distance
M1	M1a : nodule(s) satellite(s) dans un lobe controlatéral ; ou carcinose pleurale ou péricardique M1b : métastase(s) extra-pulmonaire(s)

TABLEAU 1 : SEPTIEME EDITION DE LA CLASSIFICATION TNM 2009 DES TUMEURS PULMONAIRES

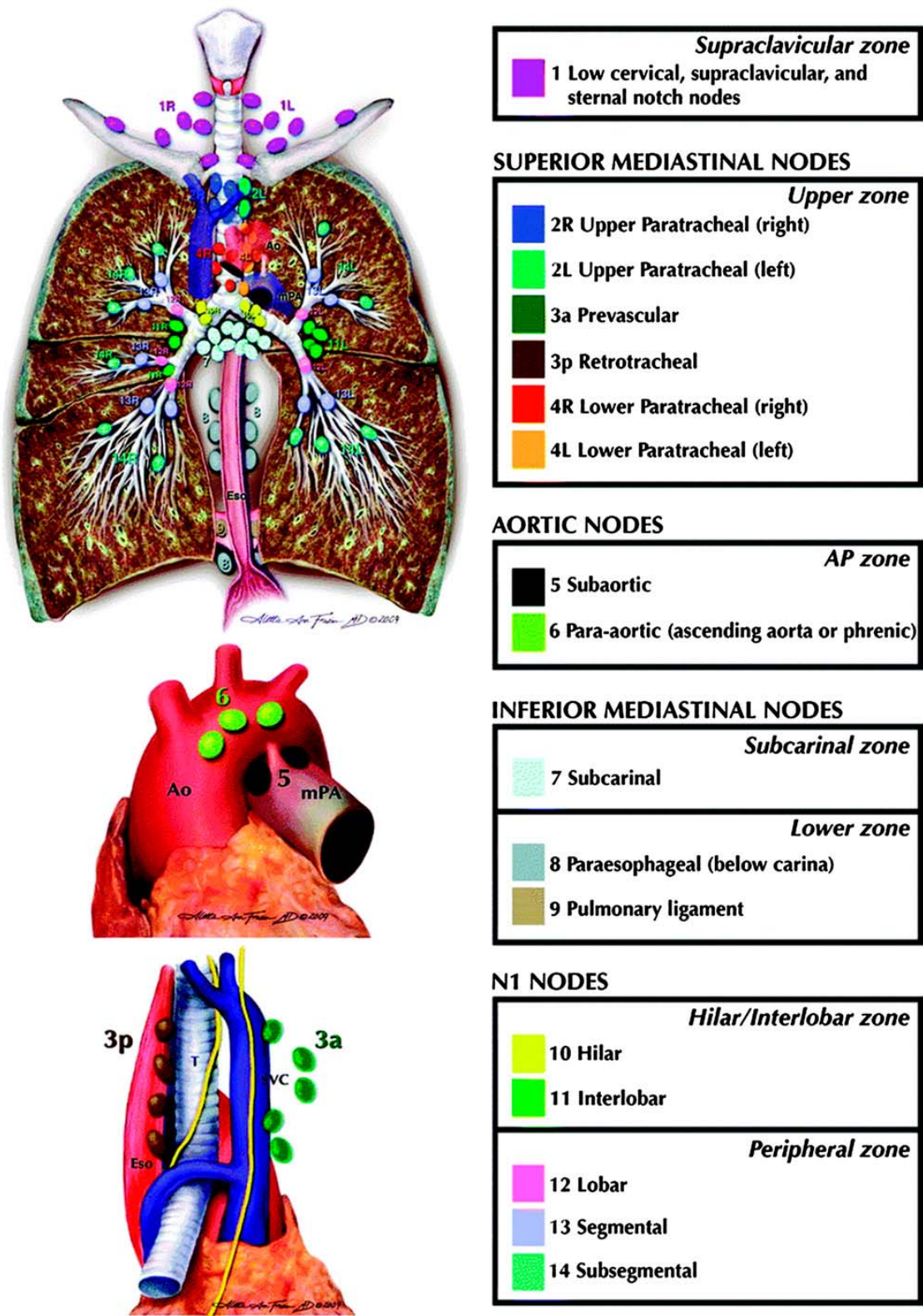


FIGURE 4 : SCHEMA REPRESENTATIF DES AIRES GANGLIONNAIRES

R : côté droit, L : côté gauche. Les ganglions N1 sont définis par les groupes 10 à 14, les ganglions N2 par les groupes 2 à 9, les ganglions N3 par les groupes 1 (sus claviculaires) ou par les ganglions controlatéraux à la tumeur. D'après Rusch *et al.*, 2009.

T/M	N0	N1	N2	N3
T1a	IA	IIA	IIIA	IIIB
T1b	IA	IIA	IIIA	IIIB
T2a	IB	IIA	IIIA	IIIB
T2b	IIA	IIIB	IIIA	IIIB
T3	IIIB	IIIA	IIIA	IIIB
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
M	IV	IV	IV	IV

TABLEAU 2 : STADE TNM 2009

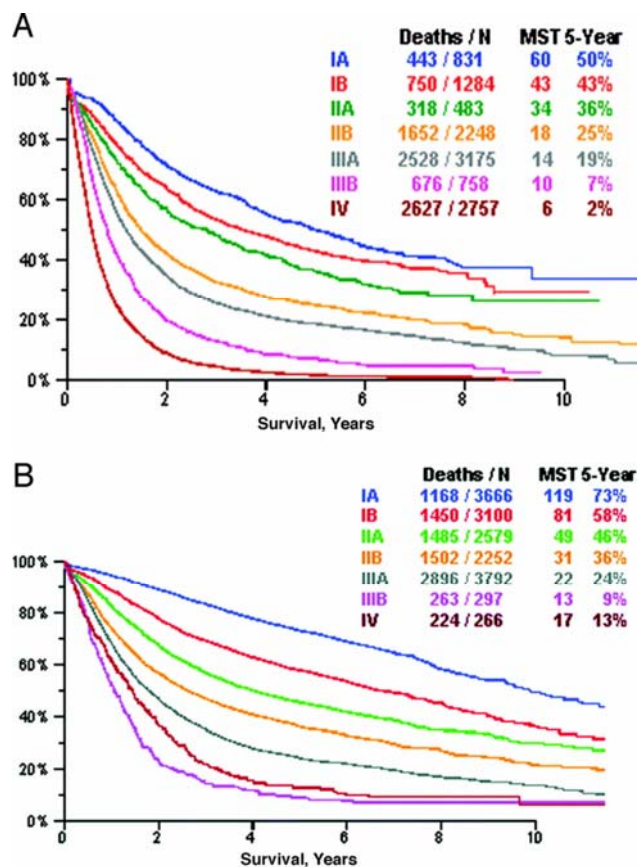


FIGURE 5 : COURBES DE SURVIE GLOBALE EN FONCTION DU STADE TNM

A : Courbes de Kaplan-Meier représentant la survie globale en fonction du stade clinique ; B: Courbes de Kaplan-Meier représentant la survie globale en fonction du stade pathologique. Deaths/N : nombre de morts sur le nombre total de patients, MST : médiane de survie (mois); 5-year : survie à 5 ans. (Detterbeck *et al.*, 2009)

4.2.2. La classification IASLC/ATS/ERS des adénocarcinomes pulmonaires

L'adénocarcinome est le type histologique le plus fréquent et correspond à plus de la moitié des carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules. La nouvelle classification a été développée par un panel d'experts internationaux comprenant des pathologistes, des chirurgiens, des oncologues, des biologistes moléculaires et des radiologues, représentants de l'IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer), de l'ATS (American Thoracic Society) et de l'ERS (European Respiratory Society) (Travis *et al.*, 2011). Cette classification ne peut s'appliquer que sur des tumeurs pulmonaires ayant bénéficiées d'une résection chirurgicale emportant la totalité de la lésion, elle ne s'applique pas aux prélèvements biopsiques (Tableau 3).

De nombreux changements sont apportés par cette classification IASLC/ATS/ERS (Tableau 4). Le plus marquant est la disparition de l'entité « carcinome bronchioloalvéolaire » car il regroupe désormais plusieurs entités différentes : -1- les adénocarcinomes *in situ*, -2- les adénocarcinomes avec invasion minimale, -3- les adénocarcinomes infiltrants à prédominance lépidique (Figure 6).

L'adénocarcinome *in situ* (AIS) est défini par une tumeur mesurant ≤ 3 cm, la prolifération cellulaire tumorale suit l'axe des cloisons alvéolaires (architecture lépidique), sans cellule tumorale à l'intérieur des alvéoles. Il n'existe ni stroma, ni invasion pleurale, ni embol tumoral vasculaire. Ils peuvent être non mucineux, mucineux ou mixtes mais la grande majorité d'entre eux ne sont pas mucineux. La survie à 5 ans est de 100% si la lésion est réséquée en totalité. La fréquence de l'AIS est rare, estimée entre 0,2 et 3 % dans la population caucasienne (Russell *et al.*, 2011), mais elle a probablement été sous-estimée à cause de l'insuffisance de détection du scanner avant la mise en place des scanners en coupes fines. Les AIS sont à distinguer des hyperplasies pneumocytaires atypiques qui sont également des lésions préinvasives, dont la taille ne doit pas dépasser 0,5 cm. La fréquence des hyperplasies pneumocytaires atypiques peut atteindre 20 % dans les lobectomies pour adénocarcinome pulmonaire (Nakahara *et al.*, 2001; Miller, 1990).

L'adénocarcinome avec invasion minimale (AIM) est une lésion très proche de l'AIS, elle mesure ≤ 3 cm, son architecture est lépidique en majorité. En revanche, elle possède un ou plusieurs territoires invasifs mesurant ≤ 5 mm chacun. Comme dans les AIS, il n'existe ni invasion pleurale, ni embol tumoral vasculaire, ni nécrose tumorale. Comme dans les AIS, ils

peuvent être non mucineux, mucineux ou mixtes. La survie à 5 ans est d'environ 100%, si la lésion est réséquée en totalité.

Les diagnostics d'AIS et d'AIM ne doivent être établis que sur des pièces de résection chirurgicale emportant la totalité de la lésion également analysée en totalité.

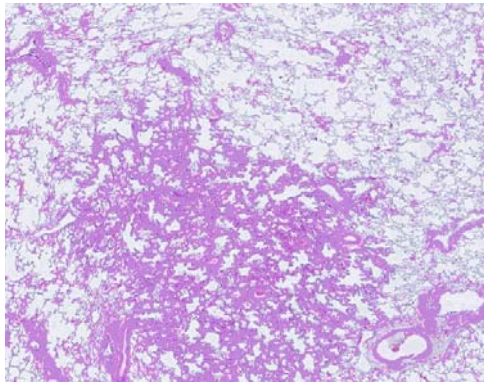
Les adénocarcinomes infiltrants

Ils représentent la majorité des adénocarcinomes car les AIS et AIM sont extrêmement rares. Ces tumeurs sont hétérogènes morphologiquement car elles sont constituées de plusieurs types architecturaux d'où leur dénomination mixte dans la classification OMS 2004. Dans la classification révisée par l'IASLC/ATS/ERS, les adénocarcinomes infiltrants sont classés selon leur architecture prédominante (Figure 6). Chacun des types architecturaux est quantifié en pourcentage, le sous-type prédominant est celui qui possède le pourcentage le plus élevé, chacun des sous-types doit représenter au moins 5% de la surface tumorale.

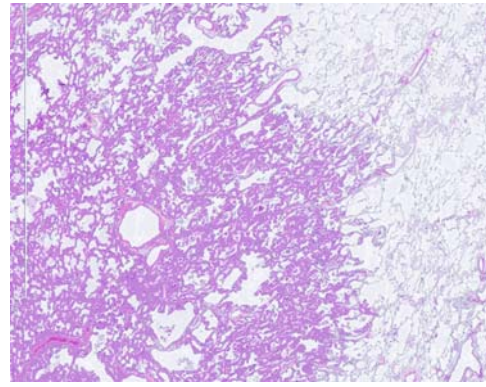
- L'adénocarcinome à prédominance lépidique : correspond à une prolifération de cellules tumorales dont la croissance suit les cloisons alvéolaires. Les adénocarcinomes infiltrants à prédominance lépidique se différencient des AIS et des AIM par une ou plusieurs des caractéristiques suivantes : taille tumorale >3 cm, territoire d'infiltration >5mm, invasion tumorale vasculaire ou de la plèvre viscérale, nécrose tumorale. La survie à 5 ans est estimée entre 86 et 90 % pour les stades I (Yoshizawa *et al.*, 2011). Le terme d'adénocarcinome à prédominance lépidique ne doit pas être utilisé pour les adénocarcinomes mucineux.
- L'adénocarcinome à prédominance tubulaire (ou acinaire) : prend différents aspects, le plus fréquent est représenté par des cellules tumorales s'agencant autour d'une lumière centrale mais il peut s'agir également de la présence d'amas tumoraux, sans lumière, dont les noyaux ont un agencement périphérique. Les agencements cribriformes font partie de l'architecture tubulaire. Il semblerait que les agencements cribriformes soient de plus mauvais pronostic que les agencements tubulaires purs (Kadota *et al.*, 2013).
- L'adénocarcinome à prédominance papillaire : correspond à une prolifération de cellules tumorales s'agencant autour d'un axe fibrovasculaire.
- L'adénocarcinome à prédominance micropapillaire : correspond à la formation de touffe cellulaire sans axe fibrovasculaire, ces cellules sont souvent retrouvées flottant dans les

alvéoles. Cette architecture, lorsqu'elle est prédominante, est associée à un mauvais pronostic.

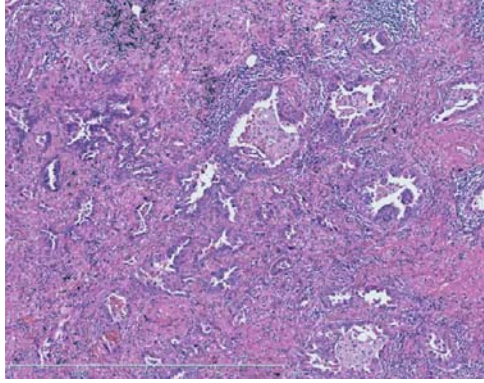
- L'adénocarcinome à prédominance solide (ou compacte) : correspond à une prolifération tumorale n'ayant pas d'architecture glandulaire mais présentant au moins 5 cellules mucosécrétantes /champs X40 sur 2 champs. Les diagnostics différentiels de ces tumeurs sont les carcinomes à grandes cellules et les carcinomes épidermoïdes peu différenciés.
- L'adénocarcinome mucineux : cette variété se distingue des autres tant sur les caractéristiques cliniques (multifocal, bilatéral), phénotypiques (souvent TTF1-, CK20 +), que moléculaire (souvent *KRAS* muté). Tous les types d'architecture peuvent se voir (lépидique, tube, papille, compacte, micropapille) mais on retrouve des flaques de mucus dans les sacs alvéolaires. Les experts tendent à s'accorder pour dire que les adénocarcinomes mucineux sont le plus souvent infiltrants et que le diagnostic d'adénocarcinome *in situ* de type mucineux est rare, probablement à réserver aux lésions de petite taille. Le pourcentage du contingent invasif doit être précisé. Ces tumeurs se présentent souvent sous forme multicentrique parfois même bilatérale. Il faut toujours penser à rechercher une tumeur primitive (digestive ou ovarienne le plus souvent).
- L'adénocarcinome de type colloïde muqueux : ces tumeurs sont constituées de flaque de mucus distendant les alvéoles et détruisant les cloisons alvéolaires. Dans ces flaques de mucus, on retrouve des amas de cellules tumorales mucosécrétantes. Une tumeur classée de type colloïde muqueux doit avoir une prédominance de ce contingent.
- L'adénocarcinome avec contingent de cellules en « bague à chaton » : ces tumeurs doivent être classées comme les autres selon leur type architectural qui est le plus souvent compact. Ces tumeurs sont assez rares et seraient selon certains auteurs associées à un réarrangement EML4-ALK (Rodig *et al.*, 2009).



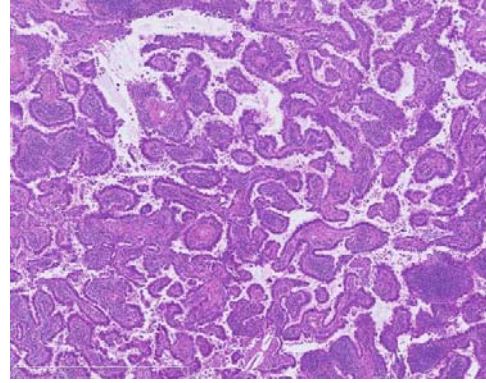
A



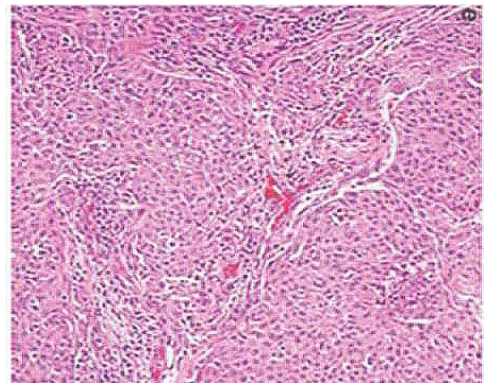
B



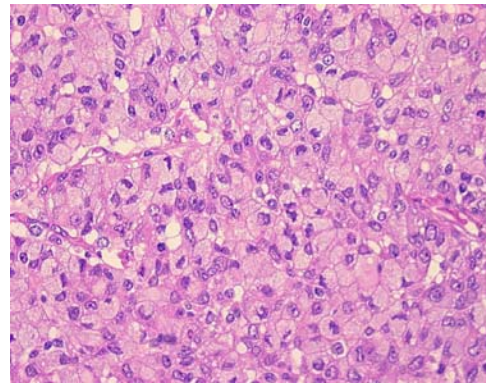
C



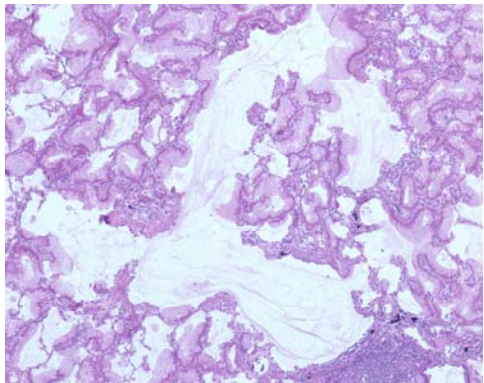
D



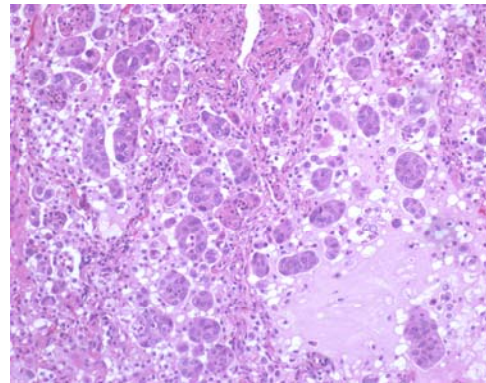
E



F



G



H

FIGURE 6: PHOTOS DE LAMES COLOREES A L'HES DES DIFFERENTS TYPES ARCHITECTURAUX D'ADENOCARCINOME PULMONAIRE SELON LA CLASSIFICATION IASLC/ATS/ERS 2011

A : adénocarcinome avec invasion minimale, B : adénocarcinome infiltrant à prédominance lépidique, C : adénocarcinome infiltrant à prédominance tubulaire, D : adénocarcinome infiltrant à prédominance papillaire, E : adénocarcinome infiltrant à prédominance solide ou compact, F : adénocarcinome infiltrant à prédominance solide avec contingent à cellules en bague à chaton, G : adénocarcinome mucineux, H : adénocarcinome infiltrant à prédominance micropapillaire.

Valeur pronostique de la classification IASLC/ATS/ERS :

Les différentes études réalisées sur des cohortes australiennes (Russell *et al.*, 2013; Russell *et al.*, 2011) asiatiques (Yoshizawa *et al.*, 2011 ; Gu *et al.*, 2013; Woo *et al.*, 2012; Yoshizawa *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Tsuta *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2012), américaine (Xu *et al.*, 2013) et européenne (Warth *et al.*, 2012) ont démontré que l'utilisation de cette classification a une valeur pronostique dans les adénocarcinomes de tous stades.

En effet, 3 groupes pronostiques ont été proposés (Yoshizawa *et al.*, 2011) :

- bas grade (de bon pronostic) comprenant les AIS et les AIM ;
- grade intermédiaire comprenant les adénocarcinomes infiltrants à prédominance lépidique, tubulaire ou papillaire ;
- haut grade (de mauvais pronostic) comprenant les adénocarcinomes infiltrants à prédominance compacte ou micropapillaire ou les adénocarcinomes mucineux.

Yoshizawa *et al* ont été les premiers à identifier trois groupes pronostiques dans les tumeurs de stade I, avec des différences significatives de survie sans maladie entre ces trois groupes. Les AIS et AIM (bas grade) avaient une survie de 100% à 5 ans; les tumeurs de grade intermédiaire (lépidique, papillaire, et tubulaire prédominant) avaient une survie à 5 ans de 90, 83 et 84%, respectivement ; et les tumeurs de haut grade (adénocarcinome mucineux, solide et micro-papillaire prédominant) avaient une survie à 5 ans de 75, 70 et 67%, respectivement (Yoshizawa *et al.*, 2011).

Dans l'étude de Tsuta *et al*, la survie sans maladie à 5 ans est également de 100% pour les AIS et les AIM et il existe une différence significative entre la survie globale des AIS et des AIM comparée aux pT1 où ont été exclus les AIS et AIM ($p < 0.0001$) (Tsuta *et al.*, 2013). Une étude prospective est en cours pour déterminer si à l'avenir les AIS et les AIM doivent être classés pTis ou pT1. De même, deux revues récentes et une métaanalyse concernant les résections infra-lobaires (segmentectomies et résections atypiques) des adénocarcinomes *in situ* ou avec invasion minimale mesurant < 2 cm, concluent que la survie et le taux de récurrence sont comparables à ceux des lobectomies (Rami-Porta and Tsuboi, 2009; Blasberg *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2012). Ainsi, les résections infra-lobaires sont généralement considérées acceptables pour les nodules en verre dépoli mesurant < 2 cm. En revanche, la lobectomie reste le traitement standard pour les tumeurs de 2 cm ou moins lorsque l'aspect radiologique est de type solide correspondant le plus vraisemblablement à des carcinomes invasifs. Deux études prospectives randomisées sont en cours (JCOG 0802 au Japon, CALGB 140503 aux Etats Unis) comparant l'efficacité de la lobectomie versus la résection infra-lobaire.

<p>Lésions pré-invasives Hyperplasie pneumocytaire atypique Adénocarcinome <i>in situ</i> (≤ 3 cm, anciennement carcinome bronchiolo-alvéolaire) : mucineux, non mucineux ou mixte.</p>
<p>Adénocarcinome avec invasion minime (≤ 3 cm avec invasion ≤ 5 mm) : mucineux, non mucineux ou mixte.</p>
<p>Adénocarcinome invasif prédominance lépidique (anciennement carcinome bronchiolo-alvéolaire) prédominance tubulaire prédominance papillaire prédominance micropapillaire prédominance solide Autres variants des adénocarcinomes invasifs : Adénocarcinome mucineux à prédominance lépidique Cystadénocarcinome mucineux Adénocarcinome colloïde Adénocarcinome fœtal Adénocarcinome entérique</p>

TABLEAU 3 : CLASSIFICATION IASLC/ATS/ERS 2011 DES ADENOCARCINOMES PULMONAIRES

Cette classification n'est applicable qu'aux pièces de résection chirurgicale emportant la totalité de la tumeur (Travis *et al.*, 2011).

Classification OMS 2004	Classification IASLC/ATS/ERS 2011
Terme « bronchiolo-alvéolaire non mucineux »	Correspond à différentes catégories : Adénocarcinome <i>in situ</i> Adénocarcinome avec invasion minime Adénocarcinome infiltrant à prédominance lépidique
Terme « bronchiolo-alvéolaire mucineux »	Adénocarcinome infiltrant mucineux
Adénocarcinome infiltrant mixte	Adénocarcinome infiltrant à prédominance tubuleux, papillaire, solide, lépidique ou micropapillaire
Adénocarcinome à cellules claires	Adénocarcinome infiltrant à prédominance (type architectural décrit ci-dessus) avec contingent à cellules claires.
Adénocarcinome à cellules en bague à châton	Adénocarcinome infiltrant à prédominance (type architectural décrit ci-dessus) avec contingent à cellules en bague à châton.

TABLEAU 4 : CORRESPONDANCE DE LA CLASSIFICATION OMS 2004 AVEC LA CLASSIFICATION IASLC/ATS/ERS 2011

Adapté de (Travis *et al.*, 2011).

Apport de la classification IASLC/ATS/ERS dans les prélèvements de petite taille

Environ 70% des patients atteints d'un CBPNPC sont diagnostiqués à un stade tardif, pour ces patients seuls des prélèvements de petite taille seront disponibles. La gestion de ces prélèvements de petite taille doit donc prendre en compte l'analyse histologique permettant le diagnostic mais aussi l'étude moléculaire à visée thérapeutique. Dans le passé, la distinction entre carcinome épidermoïde et adénocarcinome avait peu d'importance car il n'y avait pas d'implication thérapeutique majeure. Depuis l'apparition de nouvelles thérapies, la précision du type histologique et la distinction entre adénocarcinome et carcinome épidermoïde est majeure. En effet, les altérations géniques *EGFR*, *ALK* et plus récemment *ROS1* associées à la prescription de thérapies ciblées, ne sont retrouvées presque exclusivement que dans les adénocarcinomes. De même, le pemetrexed et le bevacizumab sont des thérapies plus adaptées aux adénocarcinomes. Le pemetrexed a été démontré plus efficace dans les adénocarcinomes que dans les carcinomes épidermoïdes (Ciuleanu *et al.*, 2009; Scagliotti *et al.*, 2009). Le bevacizumab est associé à des hémorragies parfois mortelles dans les carcinomes épidermoïdes proximaux (Johnson *et al.*, 2004). Enfin, la gemcitabine est plus efficace dans les carcinomes épidermoïdes que dans les adénocarcinomes (Scagliotti *et al.*, 2008). D'après ces données, il est donc apparu essentiel de distinguer les carcinomes épidermoïdes des adénocarcinomes et d'éviter le terme de carcinome non à petites cellules NOS (not other specified ou SAI : sans autre indication). Dans la classification IASLC/ATS/ERS des adénocarcinomes, il est recommandé d'utiliser un panel de 2 marqueurs immunohistochimiques pour aboutir à un diagnostic précis lorsqu'on est en présence d'un carcinome non à petites cellules peu différencié sur une biopsie ou lorsqu'il s'agit d'un examen cytologique (Rekhtman *et al.*, 2011) (Figure 7). Le TTF1 (thyroid transcription factor 1) est présent dans 75 à 85 % des adénocarcinomes d'origine pulmonaire (Yatabe *et al.*, 2002 ; Lau *et al.*, 2002). La protéine P63 est positive dans les carcinomes épidermoïdes avec la cytokératine CK5/6, mais plus d'un tiers des adénocarcinomes peut être positif pour la P63, la protéine P40 serait plus spécifique (Au *et al.*, 2004 ; Nicholson *et al.*, 2010). La classification IASLC/ATS/ERS des adénocarcinomes n'est pas applicable sur les prélèvements biopsiques ou sur les prélèvements cytologiques car ils ne sont pas représentatifs de la totalité de la tumeur. De même, le terme de carcinome à grandes cellules ne doit être retenu que sur les prélèvements d'exérèse chirurgicale car l'examen de la totalité de la tumeur est nécessaire pour exclure un contingent bien différencié.

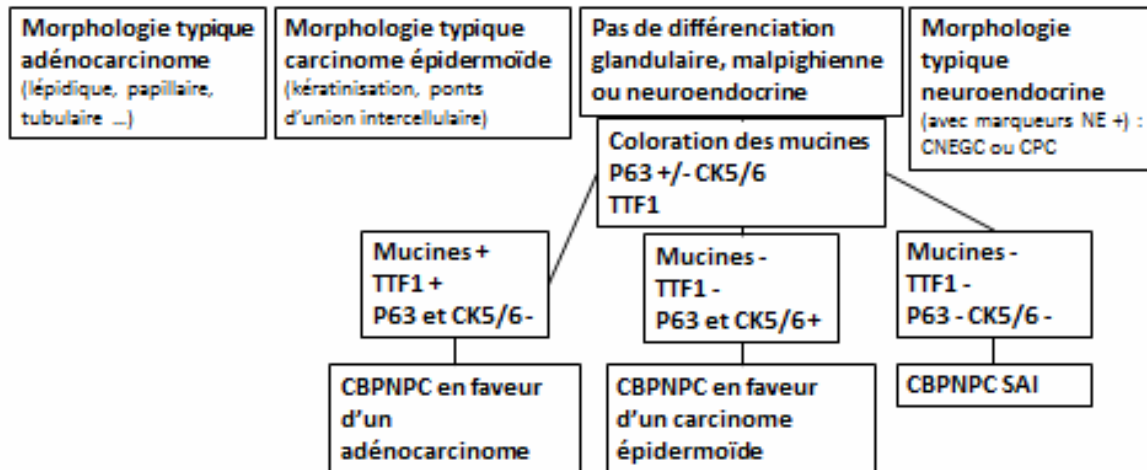


FIGURE 7 : ALGORITHME DIAGNOSTIQUE POUR LES PRELEVEMENTS DE PETITE TAILLE

Lorsque la morphologie n'est pas suffisante pour préciser le diagnostic et en particulier pour différencier un adénocarcinome d'un carcinome épidermoïde, la coloration des mucines et l'utilisation de 2 marqueurs immunohistochimiques TTF1, P63 (+/- CK5/6) peut aider pour classer la tumeur.

CNEGC : carcinome neuro-endocrine à grandes cellules, CPC : carcinome à petites cellules, CBPNPC : carcinome bronchopulmonaire non à petites cellules, SAI : sans autre indication. Les marqueurs neuro-endocrine (NE) sont la chromogranine A et la synaptophysine.

5) La prise en charge thérapeutique des carcinomes pulmonaires

La prise en charge thérapeutique des carcinomes pulmonaires dépend de plusieurs paramètres : en premier lieu du type histologique car elle diffère entre le carcinome broncho-pulmonaires à petites cellules (CPC) et le carcinome broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBPNPC). Elle dépend également de l'étendue du cancer et donc du stade TNM au moment du diagnostic.

Le traitement des CPC est basé sur une chimiothérapie à base de sels de platine et d'étoposide, qui est associée à une radiothérapie thoracique pour les stades localisés. On propose également une radiothérapie cérébrale prophylactique en cas de réponse au traitement initial. La chirurgie n'a pas d'indication dans la prise en charge des CPC, sauf dans des circonstances exceptionnelles.

Dans les CBPNPC de stade précoce (stades I et II), la résection chirurgicale constitue le traitement de référence, elle comprend une lobectomie ou une pneumonectomie associée à un curage ganglionnaire. Elle peut être complétée par la radiothérapie en cas d'atteinte pariétale ou lorsque l'exérèse est incomplète. Une chimiothérapie postopératoire est proposée en cas d'atteinte ganglionnaire ou de tumeur de taille > 3 cm. Pour les CBPNPC localement avancés (stade III), la faisabilité d'une chirurgie est toujours évaluée, elle est généralement précédée d'une chimiothérapie néoadjuvante. Si la chirurgie n'est pas réalisable, le traitement local reposera sur une radiothérapie complétée par une chimiothérapie. Pour les stades métastatiques (stade IV), la chimiothérapie et/ou les thérapies ciblées sont le traitement de référence.

Les recommandations thérapeutiques dans les carcinomes non à petites cellules :

- Stade I : le traitement de référence est la chirurgie. Pour les stades IA ($T1 \leq 3$ cm, N0) : il n'y a pas d'indication à une chimiothérapie ou une radiothérapie adjuvante. Pour les stades IB ($T2 > 3$ cm et ≤ 5 cm N0) : une chimiothérapie adjuvante peut être discutée, s'il existe des facteurs de mauvais pronostic (envahissement de la plèvre viscérale ou envahissement vasculaire). Il n'y a pas d'indication à une radiothérapie périopératoire.

Seuls les cas de contre-indications chirurgicales peuvent justifier d'une prise en charge non chirurgicale, soit par radiothérapie stéréotaxique, soit par radiofréquence pour les tumeurs < 3 cm.

- Stade II : le traitement de référence des cancers de stade II repose sur la chirurgie suivie d'une chimiothérapie adjuvante. En cas d'atteinte pariétale (pT3), la radiothérapie pariétale est recommandée.

Seuls les cas de contre-indications chirurgicales peuvent justifier d'une prise en charge non chirurgicale, par radiothérapie externe conformationnelle à visée curative qui pourra être associée à une chimiothérapie.

- Stade III : la chirurgie sera réalisée lorsque la résécabilité de la tumeur est possible et que l'état du patient le permet. Les tumeurs classées T3N1 ou T4N0-1 sont souvent plus difficilement résécables. Pour les tumeurs T1-3N2, deux attitudes peuvent être discutées : soit la chimiothérapie néoadjuvante suivie d'une chirurgie +/- radiothérapie adjuvante ; soit la chirurgie suivie d'une chimiothérapie adjuvante +/- radiothérapie adjuvante. La radiothérapie médiastinale doit être proposée pour les atteintes résiduelles N2. En revanche, les tumeurs T1-4N3 ne sont pas réséquables. Pour ces patients, le traitement de référence repose sur une chimioradiothérapie concomitante, à base de sels de platine.

- Stade IV : le traitement de 1ère ligne dépend de la présence ou non d'une mutation activatrice du gène *EGFR*.

En l'absence de mutation du gène *EGFR*, la prise en charge repose sur le traitement systémique sur la base d'une bithérapie associant une molécule de troisième génération à du cisplatine. En cas de contre-indication au cisplatine, le carboplatine est indiqué en substitution. En cas de contre-indication aux sels de platine, une bithérapie associant deux molécules de troisième génération peut être proposée. Les molécules de troisième génération ayant à ce jour montré un bénéfice en première ligne de traitement sont : la gemcitabine, les taxanes (docétaxel et paclitaxel), la vinorelbine et le pemetrexed, ce dernier n'étant utilisé que pour les carcinomes non épidermoïdes. En cas de tumeur à prédominance non épidermoïde, le bévacizumab peut également être ajouté à l'association -molécule de troisième génération-sels de platine-, dans ce cas le bévacizumab est maintenu jusqu'à progression de la maladie. Les inhibiteurs de tyrosine kinase ne sont pas indiqués chez ces patients. La durée optimale du traitement se situe entre 4 et 6 cycles de chimiothérapie.

En présence d'une mutation du gène *EGFR*, le traitement de référence est basé sur l'utilisation en première ou en deuxième ligne d'un inhibiteur de tyrosine kinase (ITK : gefitinib ou erlotinb) en monothérapie (Tableau 5). Il n'y a pas de bénéfice en terme de survie globale démontré à ce jour à prescrire un ITK en première ligne ou en deuxième ligne. L'ITK est maintenu jusqu'à progression de la maladie. Il est contre-indiqué d'associer les ITK à la chimiothérapie.

Le traitement de 2ème ligne repose sur une monothérapie, par une chimiothérapie de troisième génération (pemetrexed pour les tumeurs non épidermoïde ou docétaxel) ou une thérapie ciblée (ITK anti-EGFR) pour les tumeurs sans mutation *EGFR*. Pour les tumeurs mutées *EGFR*, on débute l'ITK si le patient n'a pas reçu d'ITK en première ligne. Si le patient rechute sous ITK, le traitement repose sur une chimiothérapie de première ligne, il n'est pas recommandé de traiter par un nouvel inhibiteur de tyrosine kinase.

Dans les cas particuliers des métastases viscérales en nombre limité, une approche à visée curative par chirurgie de la tumeur primitive et des métastases peut être envisagée en cas de métastase pulmonaire ou surrénalienne unique ; ou de ≤ 3 métastases cérébrales, cette chirurgie est associée à une chimiothérapie complémentaire.

Molécules	Cible	Indication
Erlotinib (Tarceva™) Gefitinib (Iressa™)	EGFR	1ère ligne : CBPNPC muté <i>EGFR</i> de stade avancé (erlotinib et gefitinib) 2ème ligne : CBPNPC quel que soit le statut <i>EGFR</i> , après échec d'au moins 1 ligne de chimiothérapie (uniquement pour l'erlotinib)
Crizotinib (Xalcori™)	ALK	Adénocarcinome réarrangé <i>ALK</i> de stade avancé en 2ème ligne
Bevacizumab (Avastin™)	VEGF	Carcinome non épidermoïde
Pemetrexed (Alimta™)	Folates (bases puriques et pyrimidiques)	Carcinome non épidermoïde

TABLEAU 5 : PRINCIPALES THERAPIES CIBLEES UTILISEES DANS LES CARCINOMES PULMONAIRES NON A PETITES CELLULES.

6) Les altérations moléculaires des CBPNPC

L'amélioration de nos connaissances en biologie moléculaire des cancers a permis d'identifier les principales voies de signalisation cellulaire impliquées dans l'oncogenèse pulmonaire. Les récepteurs à tyrosine kinase en particulier EGFR (epidermal growth factor receptor), HER2 (human epidermal receptor 2) et ALK (anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase) initient des voies d'oncogenèse majeures.

6.1. Le récepteur à l'EGF

Le gène *EGFR* est situé sur le chromosome 7p11.2, il contient 28 exons et code pour une protéine de 1091 acides aminés, exprimée tant dans les cellules normales que tumorales. Ce récepteur est constitué d'un domaine N-terminal extracellulaire permettant la fixation du ligand, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine C-terminal à activité tyrosine kinase. Ce récepteur à activité tyrosine kinase appartient à la famille des récepteurs HER (human epidermal receptor), qui est constituée de 4 membres : HER1 (ERBB1, EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor), HER2 (ERBB2), HER3 (ERBB3), et HER4 (ERBB4) (Figure 8). ERBB2 ne possède pas de ligand et ERBB3 ne possède pas d'activité kinase, c'est pour cela que ces deux récepteurs sont dénommés respectivement récepteur sourd et récepteur muet (Roskoski, 2014). En l'absence de ligand, le récepteur est sous forme monomérique, inactif. Lors de la fixation d'un ligand, par exemple : EGF (epidermal growth factor) ou TGFalpha (transforming growth factor), les récepteurs se dimérisent et deviennent actifs. Il peut s'agir d'une homodimérisation (deux monomères identiques) ou d'une hétérodimérisation (deux monomères différents) (Schlessinger, 2002). L'activation du récepteur grâce à la dimérisation permet une autophosphorylation des résidus tyrosines du domaine intracellulaire ce qui permet ensuite le recrutement de protéines adaptatrices possédant des domaines SH2 (Src homology domain 2) et PTB (phosphotyrosine binding) reconnaissant les phosphoprotéines du récepteur activé (Morandell *et al.*, 2008). Ceci va permettre la transduction du signal de la surface cellulaire au noyau en entraînant l'activation de plusieurs voies de signalisation : RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT (phosphatidylinositol 3-kinase) et PLC (phospholipase C). Le choix de la voie de signalisation dépend de la nature de la dimérisation ; en effet, différentes combinaisons de récepteurs peuvent aboutir à des réponses biologiques variables (Cai *et al.*, 2008). Par exemple, l'homodimère EGFR/EGFR active préférentiellement la voie des RAS/RAF/MAP, alors que l'hétérodimère EGFR/HER2 active les voies PLC et

PI3K/AKT induisant une prolifération cellulaire plus importante. La voie des RAS/RAF/MEK joue un rôle clé dans le cycle cellulaire, la migration et la survie cellulaire (Gazdar, 2009). L'activation de la voie des PI3K/AKT favorise l'angiogenèse, stimule la prolifération cellulaire et réprime l'apoptose (Engelman, 2009).

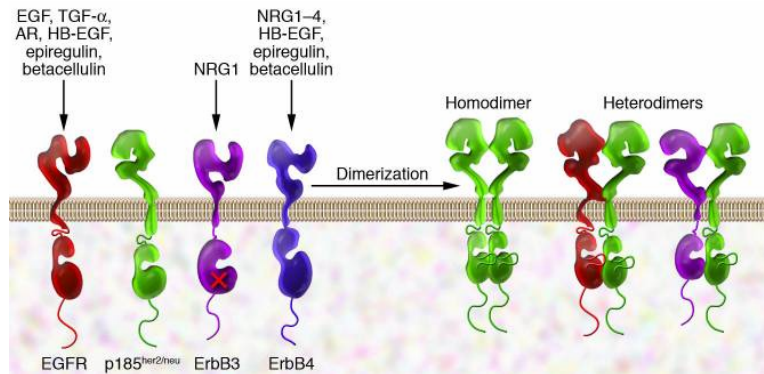


FIGURE 8 : LES RECEPTEURS DE LA FAMILLE HER/ERBB ET SES LIGANDS

Les quatre membres possèdent un domaine N-terminal extracellulaire portant le site de fixation du ligand, un domaine transmembranaire, un domaine tyrosine kinase intracytoplasmique, et un domaine C-terminal riche en site de phosphorylation permettant la transduction du signal. ErbB2 (ou p185 her2/neu) ne possède pas de ligand. ErbB3 n'a pas d'activité tyrosine kinase (croix rouge). Tous ces récepteurs s'homo ou s'hétérodimérisent. D'après Zhang *et al.*, 2007.

Plusieurs modes d'activation oncogénique de *EGFR* ont été décrits (Voldborg *et al.*, 1997) (Pines *et al.*, 2010) :

- l'augmentation de l'expression protéique d'EGFR qui peut provenir de différents mécanismes : augmentation de la transcription, stabilisation au niveau membranaire par inhibition de son internalisation ou de sa dégradation, ou encore amplification du gène.
- les mutations activatrices d'*EGFR* ayant pour conséquence l'expression d'une forme du récepteur constitutionnellement active.
- l'augmentation de l'expression des ligands (TGF α).

6.1.1. La surexpression protéique d'EGFR :

Le récepteur à l'EGF est surexprimé dans de nombreux types tumoraux (Salomon *et al.*, 1995) (Nicholson *et al.*, 2001) dont le carcinome pulmonaire non à petites cellules (Hirsch *et al.*, 2008). La surexpression de EGFR est retrouvée dans 60 % des patients atteints de carcinome broncho-pulmonaire non à petites cellules, elle serait associée à un plus mauvais pronostic (Hirsch *et al.*, 2003). La surexpression protéique ne confère pas de sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR (Hirsch *et al.*, 2006 ; Lacroix *et al.*, 2009). Néanmoins, une étude de phase 3 a démontré un bénéfice de l'utilisation des anticorps monoclonaux (cetuximab) en association avec une chimiothérapie à base de platine chez les patients porteurs d'un carcinome épidermoïde ou d'un adénocarcinome surexprimant EGFR, la surexpression était mise en évidence par une technique immunohistochimique (Pirker *et al.*, 2012).

La surexpression protéique peut être liée à une amplification du gène qui est définie par plus de 2 copies du gène par noyau. L'amplification du gène *EGFR* est retrouvée dans 30% des carcinomes épidermoïdes et dans 15% des adénocarcinomes mais jamais dans les carcinomes à petites cellules (Hirsch *et al.*, 2003). Cette amplification est souvent associée à une mutation activatrice du gène qui précède généralement l'amplification (Yatabe *et al.*, 2008), mais elle peut être retrouvée sans mutation *EGFR* associée (Li *et al.*, 2008). Certains auteurs suggèrent que l'augmentation du nombre de copies du gène est caractéristique de la progression tumorale et du haut grade histologique de l'adénocarcinome (Soh *et al.*, 2008), et que les lésions préneoplasiques (hyperplasie pneumocytaire atypique) et préinvasives (adénocarcinome *in situ*) possèderaient rarement d'amplification (Yatabe *et al.*, 2008).

L'impact prédictif de l'amplification est difficile à déterminer car d'une part, il est difficile d'affirmer que l'amplification a lieu sur l'allèle muté et non sur l'allèle sauvage et d'autre part, car l'amplification est souvent associée à la mutation ; ce qui rend difficile l'évaluation de l'impact de l'amplification seule.

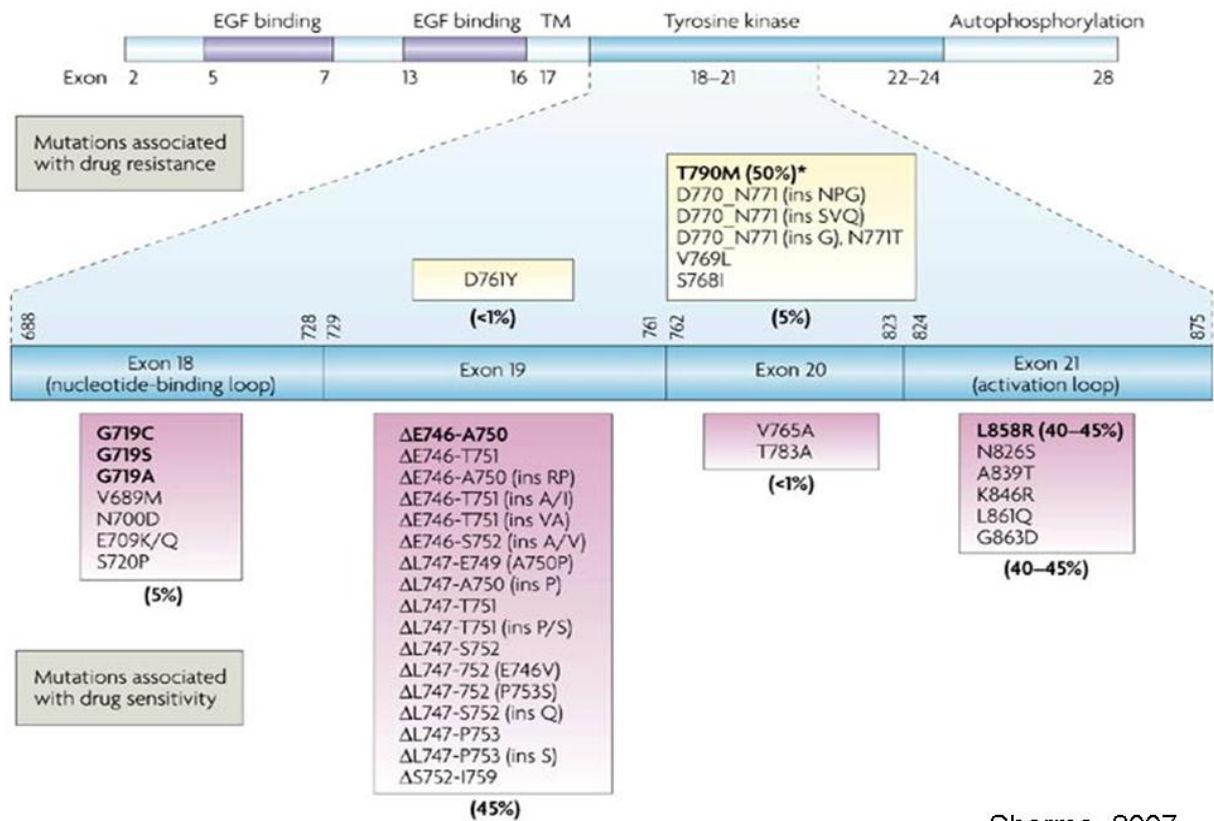
6.1.2. Les mutations du gène *EGFR* :

Les mutations *EGFR* dans les cancers du poumon ont été décrites en 2004 (Lynch *et al.*, 2004) (Pao *et al.*, 2004). Elles sont situées au niveau de la poche à ATP du domaine tyrosine kinase, codé par les exons 18 à 21. Plus de 145 mutations ont été décrites (Horn *et al.*, 2011). Il s'agit de mutations somatiques et hétérozygotes. Les mutations les plus fréquentes (> 85%) sont constituées par les délétions en phase de l'exon 19 et par la mutation ponctuelle sur l'exon 21 (p.L858R) ; ces deux mutations représentent environ 85% des mutations *EGFR*. Les

autres mutations, plus rares, sont constituées par des substitutions dans l'exon 18 (p.G719A, p.G719C, p.G719S), des substitutions dans les exons 20 et 21 (p.T790M, p.L861X respectivement), des insertions de 1 à 3 acides aminés dans l'exon 20 et des insertions dans l'exon 19 (Figure 9) (He *et al.*, 2012). Les mutations *EGFR* sont essentiellement retrouvées dans les adénocarcinomes (Coate *et al.*, 2009) et particulièrement ceux comportant une architecture lépidique comme les adénocarcinomes à prédominance lépidique, les AIS ou AIM (Riely *et al.*, 2006 ; Marchetti *et al.*, 2005). Elles peuvent également être trouvées dans les contingents glandulaires des carcinomes adénosquameux et exceptionnellement dans les carcinomes épidermoïdes et les carcinomes à grandes cellules (Tochigi *et al.*, 2011 ; Horn *et al.*, 2011). Elles sont le plus souvent associées au sexe féminin, à l'absence de tabagisme et à la population asiatique (Rosell *et al.*, 2009 ; Shigematsu *et al.*, 2005). Dans la population caucasienne, les mutations *EGFR* sont présentes dans environ 10 à 15 % des adénocarcinomes (John *et al.*, 2009). L'identification de ces mutations dès le stade pré-invasif (adénocarcinome *in situ*) suppose que l'apparition de ces mutations est précoce dans l'oncogenèse pulmonaire (Blons *et al.*, 2006). Le rôle oncogénique des mutations *EGFR* a été démontré grâce à l'apparition, chez les modèles murins porteurs de mutations Del 19 ou p.L858R, de multiples adénocarcinomes pulmonaires (Politi *et al.*, 2006).

La mutation *EGFR* variant III correspond à une délétion des exons 2 à 7, résultant en une absence de fixation du ligand et en une activation constitutionnelle du récepteur. Elle est retrouvée essentiellement dans les carcinomes épidermoïdes du poumon (Pedersen *et al.*, 2001) mais pas dans les adénocarcinomes (Ji *et al.*, 2006) ; elle touche préférentiellement les hommes fumeurs. Ce type de mutation est insensible aux thérapies ciblées anti-EGFR (gefitinib et erlotinib).

Les résultats des études sont contradictoires concernant le rôle pronostique des mutations du gène *EGFR*, certains retrouvent un impact pronostique positif sur la survie globale comme l'étude de Izar B *et al* portant sur 62 tumeurs *EGFR* mutées de stade I opérées (Izar *et al.*, 2013 ; Johnson *et al.*, 2013). D'autres, au contraire, retrouvent un taux de récurrence et de survie sans progression plus mauvais dans les tumeurs *EGFR* mutées par rapport aux tumeurs *EGFR* WT chez des patients possédant un CBPNPC N2 traités par chimiothérapie néoadjuvante puis chirurgie (Ahn *et al.*, 2013). Enfin, certains ne retrouvent pas de valeur pronostique sur la survie globale (Kim *et al.*, 2013; Ragusa *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014).



Sharma, 2007
Nature Reviews | Cancer

FIGURE 9 : LOCALISATION DES DIFFERENTES MUTATIONS *EGFR* ET LEUR VALEUR PREDICTIVE DE REPONSE AUX THERAPIES CIBLEES

L'ensemble des mutations intéresse le domaine tyrosine kinase du récepteur codé par les exons 18 à 21. En haut, figure les mutations associées à une résistance à la thérapie ciblée, en bas celles qui sont associées à une sensibilité. D'après Sharma *et al.*, 2007.

6.2. La protéine KRAS

Le gène *KRAS* (Kirsten Rat Sarcoma virus) appartient à la famille des petites protéines G possédant une activité GTPasique. Trois gènes *RAS* codent pour quatre protéines : HRAS, KRAS A et B et NRAS. Le rôle oncogénique de ces protéines a été découvert il y a une cinquantaine d'années par Harvey (HRAS) et Kirsten (KRAS) (Harvey, 1964; Kirsten and Mayer, 1967). RAS est activé par un récepteur à activité tyrosine kinase comme par exemple EGFR. Lorsque le récepteur est activé, il y a recrutement de la protéine GEF (guanosine nucleotide exchange factor) qui transforme la forme RAS inactive liée au GDP en forme RAS active liée au GTP. La protéine RAS couplée au GTP est ainsi activée et active à son tour la protéine RAF qui est à l'origine de phosphorylation en cascade de 2 autres kinases : MEK (mitogen-activated extracellular signal regulated kinase) et ERK (Extracellular signal Regulated Kinase). ERK activée est ensuite transloquée dans le noyau et active à son tour par phosphorylation, différents facteurs de transcription de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, comme la cycline D1 (Lurje and Lenz, 2009).

Les mutations activatrices de *RAS* confèrent à la protéine une activation constitutive en empêchant l'hydrolyse du GTP. Des modèles murins *KRAS* mutés ont démontré le potentiel oncogénique de *KRAS* induisant le développement de tumeurs pulmonaires (Johnson *et al.*, 2001). Les « hotspots » mutationnels sont essentiellement situés sur le codon 12, mais il en existe également sur les codons 13 et 61. Sur le codon 12, il s'agit de la c.34G>T (ou G12C), c.35G>T (ou G12V), c.35G>A (ou G12D), c.35G>C (ou G12A), c.34G>A (ou G12S) et c.34G>C (ou G12R), représentant respectivement 42%, 20%, 17%, 7%, 5% et 2%. Moins de 10% des mutations *RAS* sont situées sur le codon 13 et moins de 2% sur le codon 61 (Riely *et al.*, 2008; Prior *et al.*, 2012). La prévalence des mutations du gène *RAS* dépend de l'origine ethnique des patients, les mutations sont plus fréquentes dans la population caucasienne que chez les asiatiques (Gao *et al.*, 2010 ; Hunt *et al.*, 2002). Chez les caucasiens, la fréquence de mutation dans les adénocarcinomes pulmonaires est de 20 à 30% (Riely *et al.*, 2008), ces mutations sont beaucoup plus rares (environ 5 %) dans les carcinomes épidermoïdes (Graziano *et al.*, 1999 ; Roberts and Der, 2007). Les mutations du gène *RAS* sont plus fréquentes chez les fumeurs que chez les non-fumeurs. De plus, le type de mutations diffère entre les fumeurs et les non-fumeurs, les non-fumeurs ont plus fréquemment une substitution G→A, alors que les fumeurs ont des substitutions G→T ou G→C (Riely *et al.*, 2008). La plupart des études montrent que les mutations des gènes *KRAS* et *EGFR* sont exclusives mais

il existe quelques cas exceptionnels de tumeur présentant les deux mutations de manière concomitante.

Malgré les nombreuses années de recherche concernant le CBPNPC, le rôle pronostique de *KRAS* est encore débattu. Slebos *et al* ont été les premiers à suggérer que les mutations *KRAS* étaient associées à un mauvais pronostic (Slebos *et al.*, 1990). Depuis, trois méta-analyses ont été publiées, et seraient en faveur d'un impact défavorable des mutations *KRAS* sur la survie. Dans la méta-analyse de Huncharek portant sur 8 études, il n'a pas pu être mis en évidence de valeur pronostique des mutations *KRAS*, même s'il existait une tendance à un mauvais pronostic, car les données de l'ensemble des 8 études étaient très hétérogènes. En effet, ces études n'analysaient pas le même type histologique, les mêmes mutations et les techniques de mise en évidence des mutations étaient différentes (Huncharek *et al.*, 1999). Dans la méta-analyse de Mascaux portant sur 28 études, les mutations *KRAS* sont retrouvées associées à un mauvais pronostic (Mascaux *et al.*, 2005). Enfin, dans la méta-analyse la plus récente portant sur 41 études, les mutations *KRAS* semblent également avoir une valeur pronostique péjorative particulièrement dans les adénocarcinomes de stade précoce (Meng *et al.*, 2013). La valeur pronostique dépendrait également du type de mutation ; en effet, une étude a montré que les tumeurs pulmonaires mutées *KRAS* au niveau du codon 13 sont de moins bon pronostic, en terme de survie sans progression et de survie globale, que celles situées sur le codon 12 (Metro *et al.*, 2012).

6.3. La protéine BRAF

Il s'agit d'une sérine/thréonine kinase activée par *KRAS*. Les premières mutations de *BRAF* ont été décrites dans les mélanomes en 2002 (Davies *et al.*, 2002). Elles ont depuis été retrouvées dans les cancers du côlon (Yuen *et al.*, 2002), les carcinomes papillaires de la thyroïde (Kimura *et al.*, 2003) et les leucémies à tricholeucocytes (Tiacchi *et al.*, 2011). Les mutations *BRAF* sont retrouvées dans 1 à 5 % des adénocarcinomes du poumon et < 1% des carcinomes épidermoïdes (Ding *et al.*, 2008 ; Davies *et al.*, 2002 ; Paik *et al.*, 2011 ; Marchetti *et al.*, 2011). Dankort *et al* ont démontré que les mutations activatrices de *BRAF* pouvaient initier la carcinogénèse pulmonaire (Dankort *et al.*, 2007). L'épidémiologie, les critères cliniques et pathologiques ainsi que la valeur pronostique semblent différentes entre les mutations p.V600E et les non p.V600E. Les mutations p.V600E, situées dans l'exon 15, correspondant à une substitution d'une glutamine par une valine, représentent plus de 50 % des mutations *BRAF* dans les carcinomes pulmonaires (Paik *et al.*, 2011 ; Marchetti *et al.*,

2011). Ces mutations sembleraient plus fréquentes chez les femmes et chez les non-fumeurs (Marchetti *et al.*, 2011). Dans l'étude de Paik *et al.*, 50% des mutations *BRAF* concernaient la p.V600E, 39% la p.G469A située dans l'exon 11 et 11% la p.D594G située dans l'exon 15 (Paik *et al.*, 2011). Les mutations non- p.V600E sont retrouvées plutôt chez des patients fumeurs (Marchetti *et al.*, 2011). La plupart des études montrent que les mutations *BRAF* sont exclusives de celles d'*EGFR*, *KRAS* et *ALK*. Dans l'étude de Marchetti *et al.*, deux adénocarcinomes pulmonaires mutés *EGFR* (del 19) étaient mutés *BRAF* de manière concomitante.

Les mutations *BRAF* ne semblent pas avoir de valeur pronostique concernant la survie globale et la survie sans progression (Paik *et al.*, 2011 ; Marchetti *et al.*, 2011). En revanche, si l'on distingue les mutations p.V600E aux mutations non-pV600E, les patients porteurs d'une mutation p.V600E ont des survies globale et sans progression plus mauvaises que les patients non mutés p.V600E (Marchetti *et al.*, 2011).

6.4. Le récepteur HER2

La protéine HER2 ou ErbB-2/neu (Human epidermal growth factor 2) est un récepteur à activité tyrosine kinase qui appartient à la même famille qu'*EGFR* et active donc les mêmes voies de signalisation cellulaire, essentiellement PI3K-AKT et MEK-ERK (Spector and Blackwell, 2009). Son ligand n'est pas connu, il est d'ailleurs possible qu'il n'en existe pas. Lors de son activation, le récepteur HER2 s'hétérodimérise avec un autre récepteur de la famille ERBB. Le gène *HER2* est un oncogène décrit dans plusieurs cancers, 30% des cancers du sein ont une amplification de ce gène qui est associée à un plus mauvais pronostic, mais l'utilisation des anti-HER2 (trastuzumab) a permis une amélioration de leur survie (Slamon *et al.*, 2001). L'amplification de *HER2* est également retrouvée dans 10-15% des cancers gastriques ; l'utilisation du trastuzumab associée à la chimiothérapie conventionnelle montre une amélioration de la survie chez ces patients (Bang *et al.*, 2010).

Dans les cancers du poumon, environ 5 % des CBPNPC ont une amplification du gène *HER2*, il s'agit le plus souvent d'adénocarcinomes (Hirsch *et al.*, 2002) (Heinmöller *et al.*, 2003) (Pellegrini *et al.*, 2003) mais le bénéfice de l'utilisation du trastuzumab n'a pas été clairement démontré (Heinmöller *et al.*, 2003). Des mutations du gène *HER2* ont également été identifiées dans 2 à 4% des CBPNPC, essentiellement dans les adénocarcinomes (Arcila *et al.*, 2012 ; Shigematsu *et al.*, 2005 ; Tomizawa *et al.*, 2011). Ces mutations *HER2* correspondent à des insertions en phase de 3 à 12 paires de bases dans l'exon 20 codant pour

le domaine tyrosine kinase du récepteur induisant une activation constitutive du récepteur. Les souris transgéniques possédant cette mutation développent rapidement un CBPNPC, confirmant le caractère de « driver oncogénique » de ce gène (Perera *et al.*, 2009). Les mutations *HER2* semblent être exclusives des mutations *KRAS* et *EGFR* (Stephens *et al.*, 2004 ; Shigematsu *et al.*, 2005). Elles sont plus fréquentes chez les femmes et chez les non-fumeurs (Mazières *et al.*, 2013).

6.5. Les réarrangements du gène *ALK*

Le gène *ALK* (anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase) est situé en 2p23, il code pour un récepteur à activité tyrosine kinase. Il fait partie de la superfamille des récepteurs à insuline (Morris *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 1994). Il a un rôle important dans l'embryogénèse notamment dans le développement du système nerveux central (Iwahara *et al.*, 1997). Son rôle physiologique est d'inhiber l'apoptose lorsqu'il est activé (Mourali *et al.*, 2006). Le rôle oncogénique de *ALK* a été initialement décrit dans les lymphomes anaplasiques à grandes cellules (Morris *et al.*, 1994), sous la forme de la translocation t(2,5)(p23 ;q35) générant une protéine de fusion cytoplasmique *ALK-NPM* (nucléophosmine), depuis d'autres partenaires que *NPM* ont été décrits (Kinney *et al.*, 2011). D'autres tumeurs peuvent avoir une translocation du gène *ALK*, environ 50% des tumeurs myofibroblastiques inflammatoires (Coffin *et al.*, 2001), quelques rares cas de lymphomes B à grandes cellules de mauvais pronostic (Delsol *et al.*, 1997) et quelques plasmocytomes (Wang *et al.*, 2011). Des réarrangements *EML4-ALK* dans des cancers du sein, du côlon (Lin *et al.*, 2009), et du rein (Debelenko *et al.*, 2011) ont été décrits. Des mutations de *ALK* ont également été décrites dans les neuroblastomes de mauvais pronostic (Chen *et al.*, 2011 ; Janoueix-Lerosey *et al.*, 2008) et dans des carcinomes anaplasiques de la thyroïde (Murugan and Xing, 2011).

Dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules, les altérations du gène *ALK* ont été initialement décrites par Soda *et al* en 2007. Elles étaient retrouvées dans 6,7% des CBPNPC, il s'agissait d'une inversion sur le bras court du chromosome 2 résultant en un gène de fusion *ALK-EML4* (echinoderm microtubule-associated protein-like 4) (Soda *et al.*, 2007). Depuis, les études ont retrouvé des fréquences de réarrangements d'*ALK* variant de 1,6 à 13 % dans les carcinomes pulmonaires (Takahashi *et al.*, 2010 ; Shaw *et al.*, 2009 ; Rodig *et al.*, 2009; Koivunen *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2009; Martelli *et al.*, 2009; Inamura *et al.*, 2009; Shaw and Solomon, 2011). Le potentiel oncogénique de la protéine de fusion *ALK-EML4* a été démontré chez des souris transgéniques qui ont développé de multiples adénocarcinomes

pulmonaires bilatéraux quelques semaines après leur naissance avec une réponse majeure à la thérapie ciblée (Soda *et al.*, 2008).

Dans les réarrangements ALK-EML4, la région 5' d'*EML4* fusionne avec la région 3' codant pour la portion intracellulaire d'*ALK*, déléant ainsi la région 5' d'*ALK* codant pour la portion extracellulaire et transmembranaire, ce qui explique que la protéine issue de ce gène de fusion soit cytoplasmique (Figure 10). La protéine de fusion cytoplasmique chimérique EML4-ALK possède une activité tyrosine kinase constitutive, qui conduirait à la prolifération cellulaire et à l'inhibition de l'apoptose via les voies ERK/MAPK, PIK3CA/AKT et STAT (Takezawa *et al.*, 2011). La cassure sur *EML4* peut se faire sur différents exons (exons 2, 6, 13, 14, 15, 18, 20) ce qui entraîne de multiples variants d'*EML4-ALK*, mais ils possèdent tous la même région tyrosine kinase d'*ALK*, situé sur l'exon 20. Il existe au moins 11 variants EML4-ALK connus, dont la plupart sont oncogéniques (Choi *et al.*, 2008; Takeuchi *et al.*, 2008). Les variants 1 et 3 sont les plus fréquents (Figure 11). *EML4* n'est pas le seul gène partenaire d'*ALK*, il existe également trois autres partenaires connus dans les CBPNPC, *KIF5B* (Takeuchi *et al.*, 2009), *TFG* (Rikova *et al.*, 2007) et *KLC1* (Togashi *et al.*, 2012). De rares mutations *EGFR* et *KRAS* ont été retrouvées associées à des réarrangements d'*ALK* mais elles seraient exceptionnelles (Koivunen *et al.*, 2008 ; Martelli *et al.*, 2009), du même ordre que les doubles mutations *EGFR* et *KRAS*.

Les caractéristiques cliniques des patients présentant un carcinome pulmonaire réarrangé *ALK* sont le jeune âge et l'absence de tabagisme. Contrairement aux tumeurs mutées *EGFR*, les réarrangements de *ALK* ne semblent pas être plus fréquents chez les asiatiques ou chez les femmes. Les caractéristiques cliniques des différents variants EML4-ALK ne sont pas encore bien définies.

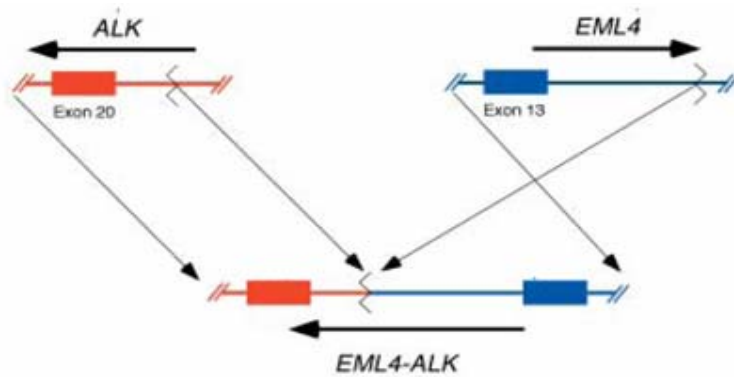


FIGURE 10 : SCHEMA DE LA TRANSLOCATION EML4-ALK

La partie N-terminale (5') du gène *EML4* s'inverse puis fusionne avec la partie C-terminale (3') du gène *ALK* codant pour le domaine tyrosine kinase, déléant ainsi la région 5' d'*ALK* codant pour la portion extracellulaire et transmembranaire.

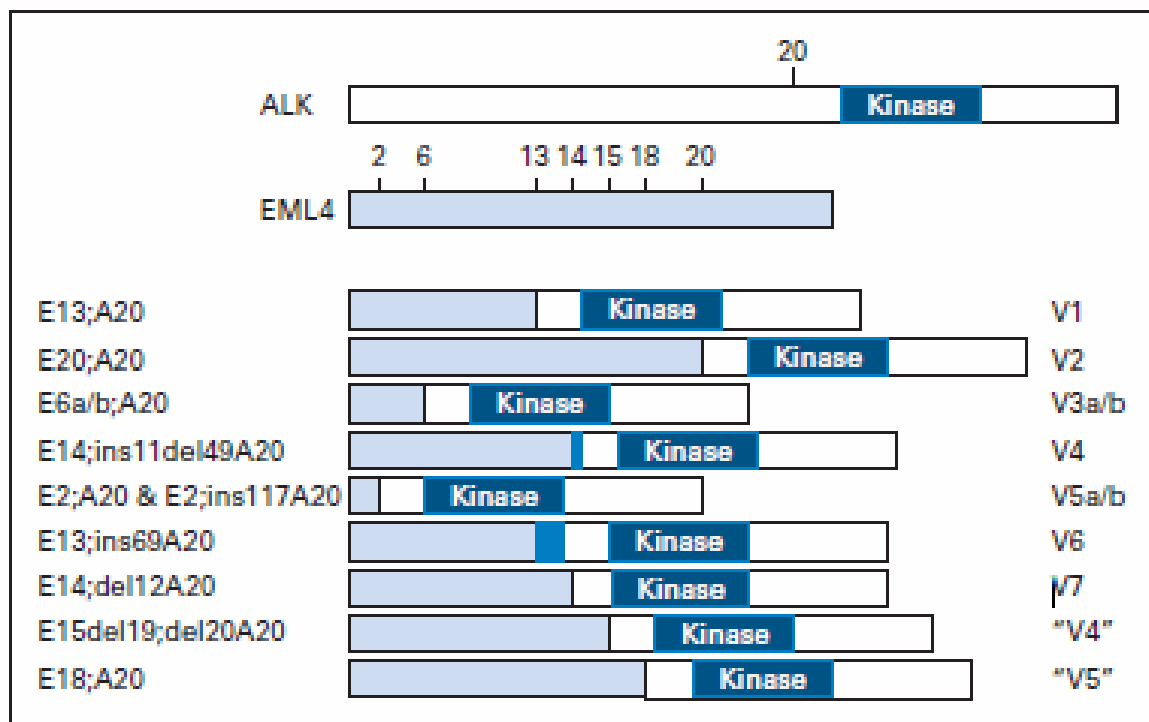


FIGURE 11 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS VARIANTS *EML4-ALK* DANS LES CARCINOMES PULMONAIRES NON A PETITES CELLULES

Au moins 11 variants (V) ont été identifiés. Ils sont tous constitués par le domaine tyrosine kinase intracellulaire d'*ALK*, codés par l'exon 20 (A20) associés à différentes portions d'*EML4* (E). Par exemple, le variant 1 résulte de la fusion de l'exon 13 d'*EML4* (E13) avec l'exon 20 d'*ALK*. Leur nomenclature est définie par le lieu de cassure sur l'exon de *EML4* (E) et de *ALK* (A). (Horn and Pao, 2009).

6.5.1. Techniques d'étude des réarrangements *ALK*

Les moyens d'étude des réarrangements d'*ALK* sont multiples, l'hybridation *in situ* (FISH) est la technique standard. En théorie, elle détecte tous les réarrangements d'*ALK*, quel que soit le partenaire. Il existe plusieurs types de sondes commercialisées. Aux Etats-Unis, la prescription de la thérapie ciblée est basée sur l'utilisation des sondes Vysis *ALK break-apart* (Abbott Molecular). Les sondes break-apart sont situées sur le domaine tyrosine kinase d'*ALK* autour du point de cassure, l'une fluoresce en rouge, l'autre en vert. Dans une cellule normale, les deux sondes sont situées côte à côte et le signal transmis est jaune, ceci pour les deux chromosomes. Dans une cellule réarrangée, seul un des chromosomes porte le réarrangement car il s'agit d'une altération somatique hétérozygote. La cassure et l'insertion d'une portion d'un autre gène (par exemple : *EML4*) éloigne les sondes l'une de l'autre, on parle alors de « split » (Figures 12 et 13). La présence de $\geq 15\%$ de cellules réarrangées sur > 50 cellules tumorales étudiées suffit pour considérer la tumeur comme éligible au traitement (Marchetti et al., 2013). Un des inconvénients de la FISH est la difficulté d'interprétation de la lecture pour certains prélèvements, notamment à cause de la proximité des gènes *ALK* et *EML4* (environ 12 Mb) qui génère parfois de minimes séparations des sondes pouvant créer des faux négatifs. Par ailleurs, la technique FISH est une technique longue et coûteuse, non adaptée comme technique de screening chez les patients porteurs d'un carcinome pulmonaire susceptibles de bénéficier d'une thérapie ciblée anti-*ALK*.

La technique immunohistochimique est une technique de routine, facile, rapide et peu onéreuse, qui semble être une bonne technique de screening des prélèvements nécessitant une technique FISH (Tableau 6). Elle met en évidence l'expression protéique d'*ALK*, qui est absente dans le poumon normal. Il existe plusieurs anticorps commercialisés disponibles sous forme de différents clones dont les plus utilisés sont les clones 5A4 et D5F3 (Figure 14). Plusieurs études ont démontré une bonne valeur prédictive positive de cette technique (90 à 100 % des immunohistochimies fortement positives sont FISH positives) et une excellente valeur prédictive négative (toutes les immunohistochimies négatives sont négatives en FISH) (Boland *et al.*, 2009 ; Yi *et al.*, 2011; Paik *et al.*, 2011; Mino-Kenudson *et al.*, 2010 ; McLeer-Florin and Lantuéjoul, 2012). Ces résultats démontrent qu'il est raisonnable de ne tester en FISH que les tumeurs positives en immunohistochimie. Néanmoins, une étude portant sur 3244 patients, dont 116 présentaient une tumeur réarrangée *ALK* FISH +, a démontré que 31% (36/116) de ces tumeurs étaient négatives en immunohistochimie. Sur ces 36 tumeurs, 11 présentaient une autre mutation associée sur *KRAS* ou *EGFR* et 9 ne correspondaient pas à un adénocarcinome (Cabillic *et al.*, 2014).

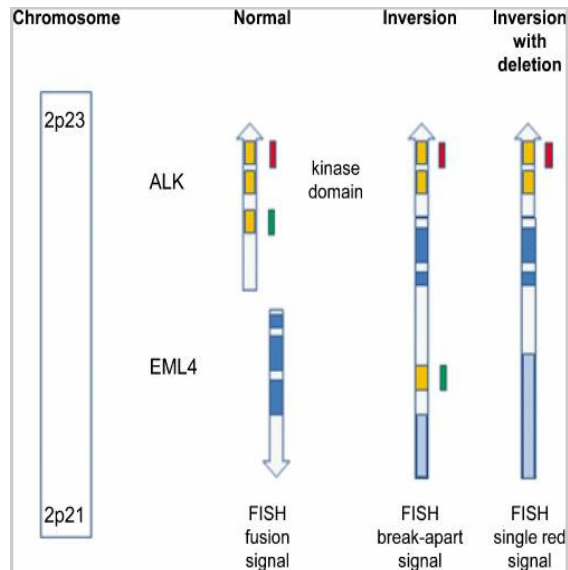


FIGURE 12 : REPRESENTATION DES DIFFERENTS TYPES DE SIGNAUX AVEC L'UTILISATION DES SONDES BREAK APART ALK

ALK et *EML4* sont situés sur le bras court du chromosome 2 dans des sens opposés. Dans une cellule normale, les 2 sondes sont situées sur *ALK* très proche l'une de l'autre ce qui génère un signal jaune (signal fusionné). L'inversion et l'insertion de *EML4* dans le domaine tyrosine kinase de *ALK* augmente la distance entre les 2 sondes et le signal apparaît comme rouge-vert séparé (split signal). Une délétion de la partie proximale d'*ALK* couplée à l'insertion d'*EML4* explique le signal rouge isolé. (Thunnissen *et al.*, 2012)

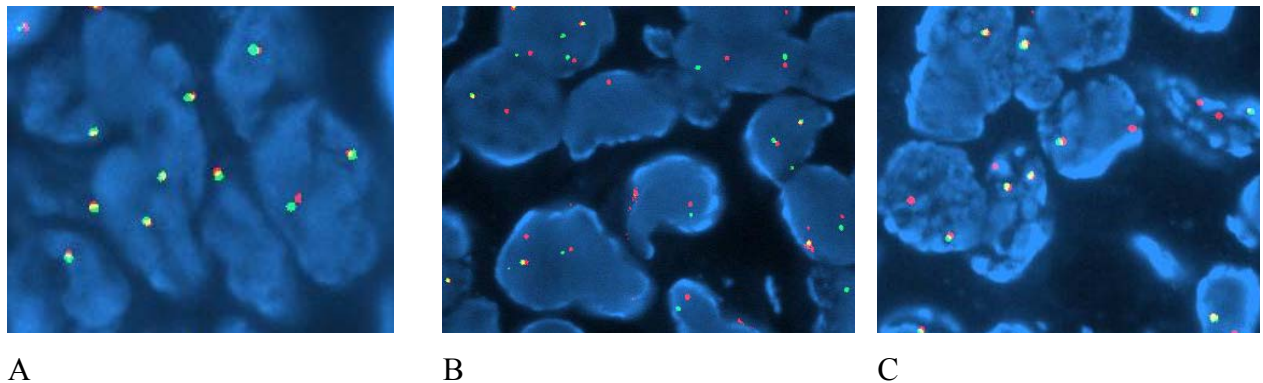


FIGURE 13 : PHOTOS DE TECHNIQUES FISH ETUDIANT LE GENE ALK

A) présence de deux signaux normaux fusionnés : absence de réarrangement ; B) Un des deux signaux est constitué de deux spots rouge et vert séparés : présence d'un réarrangement ; C) Présence d'un signal fusionné associé à un signal rouge isolé : présence d'un réarrangement

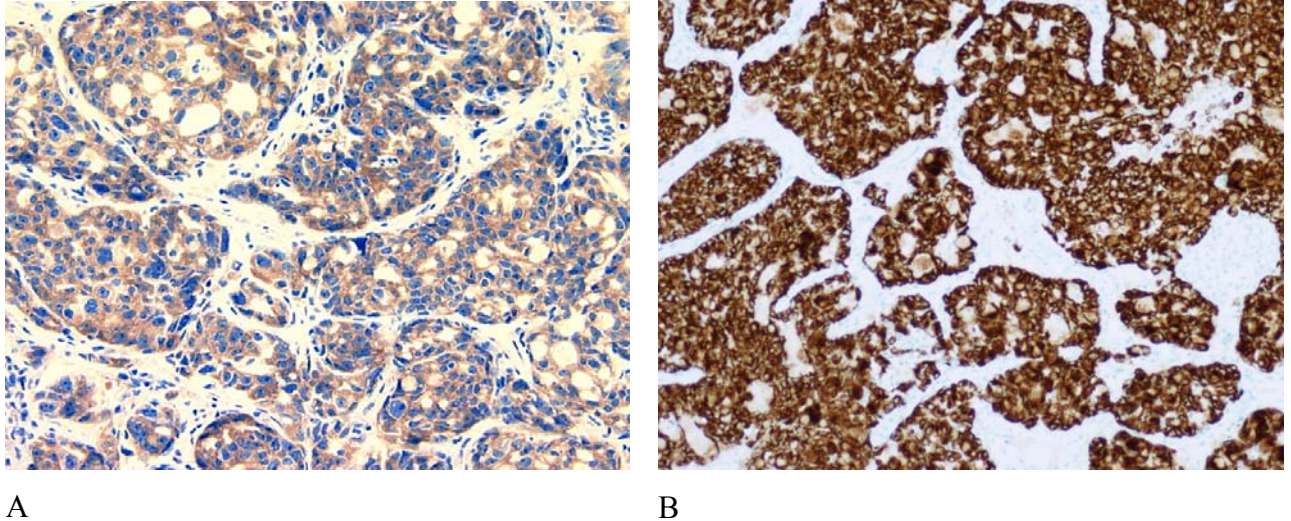


FIGURE 14 : PHOTOS DE MARQUAGE IMMUNOHISTOCHEMIQUE AVEC LES ANTICORPS ANTI-ALK

A: clone 5A4, B: clone D5F3

La RT-PCR est une technique sensible pouvant détecter de faible taux d'ARN réarrangé. Cependant, elle doit être multiplexe car l'identification des variants nécessite autant de PCR que de variants recherchés. Les autres partenaires qu'*EML4* ne sont généralement pas testés. Cette technique nécessite une assez grande quantité de matériel, ce qui exclue son utilisation pour certains prélèvements de petite taille. Elle peut s'effectuer sur matériel fixé et inclus en paraffine, car même si le formol favorise les cassures de l'ADN, la taille des amplicons pour cette technique est relativement petite. Un des avantages de la RT-PCR par rapport aux autres techniques est l'identification des différents variants ; ce qui pourrait avoir un intérêt pour la sensibilité à la thérapie ciblée (Tableau 6). En effet, il a été démontré que la sensibilité au crizotinib diffère selon le type de variants, le variant 2 possède la plus grande sensibilité, les variants 1 et 3b ont une sensibilité intermédiaire et le variant 3a est le moins sensible ; ces différences de sensibilité au traitement étant liées à des différences dans la stabilité de la protéine (Crystal and Shaw, 2012). Si ces différences de sensibilité thérapeutiques entre les différents variants se confirmaient, la RT-PCR pourrait avoir un intérêt avant la prescription de la thérapie ciblée.

Immunohistochimie	FISH (Référence)	RT-PCR
Tissus fixés au formol et inclus en paraffine		
Clonage 5A4 : très sensible (pas de faux négatif) Clonage D5F3 : très spécifique (tous les positifs sont FISH positifs)	Très sensible et spécifique (pas de faux négatifs et faux positifs en théorie)	Sensibilité : ne teste pas tous les variants de EML4 ni les autres gènes partenaires
Délai: rapide (technique automatisée et lecture rapide)	Délai: Long : sur 2 jours, non automatisé et lecture (15 min /cas)	Délai: intermédiaire sur 2 jours (automatisé) et lecture rapide
Lecture : facile ++ (subjective)	Lecture difficile (subjective)	Lecture facile +++ (non subjective)
Coût + (<10 €)	Coût +++ (150 €)	Coût ++ (15 €)
Quantité de matériel + (1 lame 5µm)	Quantité de matériel + (1 lame 3µm)	Quantité de matériel +++ (5 lames 10µm) Seule technique à identifier le type de variant

TABLEAU 6 : COMPARAISON DES DIFFERENTES TECHNIQUES DE MISE EN EVIDENCE DES REARRANGEMENTS DU GENE *ALK*

7) Associations d'anomalies moléculaires avec le sous-type histologique des adénocarcinomes

Plusieurs études ont démontré l'association entre certaines anomalies moléculaires et le type architectural prédominant de l'adénocarcinome basé sur la classification IASLC/ATS/ERS (Tableau 7).

Les mutations *EGFR* seraient plus fréquentes dans le sous-groupe pronostique intermédiaire (lépidoïque, papillaire ou tubulaire prédominant) (Takano *et al.*, 2005 ; Shim *et al.*, 2011), et dans les adénocarcinomes *in situ* ou avec invasion minime (Riely *et al.*, 2006 ; Marchetti *et al.*, 2005). Certains auteurs ont également rapporté une plus grande fréquence des mutations *EGFR* dans le sous-type micropapillaire (Song *et al.*, 2013 ; Motoi *et al.*, 2008 ; Ninomiya *et al.*, 2009).

Le sous-type mucineux serait plus souvent associé aux mutations *KRAS* (Marchetti *et al.*, 1996 ; Finberg *et al.*, 2007).

Les adénocarcinomes réarrangés *ALK* ont des aspects histologiques particuliers, souvent d'architecture cribriforme ou bien d'architecture solide avec un contingent de cellules en bague à chaton. Les architectures papillaires semblent néanmoins plus fréquentes (Inamura *et al.*, 2008 ; Shaw *et al.*, 2009 ; Rodig *et al.*, 2009 ; Wong *et al.*, 2009 ; Yoshida *et al.*, 2011). Compte-tenu de l'incidence faible des mutations *BRAF* dans les adénocarcinomes pulmonaires, il est difficile de savoir si elles sont plus fréquentes dans certains sous-types histologiques d'adénocarcinome. Cependant, il semblerait que les adénocarcinomes mutés p.V600E seraient plus souvent de type micropapillaire (Marchetti *et al.*, 2011). D'autres auteurs retrouvent une prédominance des architectures papillaire et lépidoïque dans les adénocarcinomes mutés *BRAF* (Yousem *et al.*, 2008).

Aucune donnée de la littérature ne montre d'association entre l'architecture et les adénocarcinomes mutés *HER2*.

Type d'altération	Sous-type d'adénocarcinome
<i>EGFR</i>	Lépidique non mucineux Papillaire ou tubulaire
<i>KRAS</i>	Mucineux
<i>ALK</i>	Tubulaire (cribriforme) Cellules bague à chaton
<i>BRAF</i>	Papillaire Micropapillaire

TABLEAU 7 : ASSOCIATION DES ALTERATIONS MOLECULAIRES AVEC LE TYPE D'ARCHITECTURE PREDOMINANTE DES ADENOCARCINOMES

8) Les principales thérapies ciblées des CBPNPC

8.1. Les thérapies ciblées anti-EGFR

Il existe deux grandes classes de thérapies ciblées inhibant l'EGFR : **les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs de tyrosine kinase**. Les anticorps monoclonaux (cetuximab : erbitux®, panitumumab : vectibix®) inhibent l'activation du récepteur en se liant au domaine extracellulaire et empêchent la liaison avec son ligand ; ils favorisent ainsi l'internalisation du récepteur et sa dégradation. Ils n'ont pas d'AMM dans les carcinomes pulmonaires. L'étude « FLEX trial » basée sur l'expression protéique de EGFR en immunohistochimie, a permis de démontrer un bénéfice de l'utilisation du cetuximab associée au cisplatine ou à la vinorelbine comparé à la chimiothérapie seule chez les patients porteurs d'un carcinome pulmonaire surexprimant EGFR (Pirker *et al.*, 2012).

Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) sont des formes orales, de faible poids moléculaire. Le mécanisme d'action de ces molécules repose sur l'inhibition compétitive de la liaison de l'ATP à son site de fixation (site d'activité tyrosine kinase) menant ainsi à une inhibition de la phosphorylation du récepteur et de son activité. Les ITK de première génération (erlotinib : Tarcéva® et géfitinib : Iressa®) n'agissent que sur EGFR. L'erlotinib a été le premier à recevoir une AMM en 2005 en deuxième ligne ou plus chez les patients atteints d'un CBPNPC localement avancé ou métastatique, sans restriction au statut mutationnel d'*EGFR*. En effet, l'étude publiée en 2005 par Shepherd, montrait que l'erlotinib apportait un gain de survie significatif chez les patients ayant reçu une chimiothérapie première (Shepherd *et al.*, 2005). En juin 2009, le gefitinib a reçu une AMM en première ligne chez les patients atteints d'un CBPNPC localement avancé ou métastatique, muté *EGFR*. L'étude IPASS (Iressa Pan-Asia-Study) a démontré dans la population asiatique un taux de réponse objective et une survie sans progression meilleure chez les patients atteints de CBPNPC mutés *EGFR* traité par gefitinib comparé au carboplatine mais pas d'effet sur la survie globale (Mok *et al.*, 2009), de plus il a été également démontré qu'il y avait un bénéfice de la chimiothérapie comparé aux ITK anti-EGFR pour les tumeurs non mutées *EGFR*. D'autres études portant sur la population caucasienne ont démontré la même efficacité même si les mutations *EGFR* sont moins fréquentes (Rosell *et al.*, 2012). Toutes les mutations *EGFR* ne confèrent pas la même sensibilité aux ITK anti-EGFR. Les délétions de l'exon 19, les mutations ponctuelles de l'exon 21 (p.L858R, p.861Q et p.L861R) et celles de l'exon 18 (p.G719A/C/S) sont associées à une sensibilité accrue au traitement (Gazdar, 2009). Les délétions dans l'exon 19 semblent

associées à une meilleure survie chez les patients traités par ITK que les mutations p.L858R (Irmer *et al.*, 2007).

Les ITK de seconde génération, dits irréversibles (lapatinib, afatinib et dacomitinib) sont différents sur deux points : -1- ils inhibent de manière irréversible car ils se lient de manière covalente d'où leur action plus longue ; -2- leur cible est plus large car ils peuvent inhiber également d'autres récepteurs comme HER2. Actuellement, 3 ITK ont l'AMM : géfitinib et erlotinib (ITK réversibles) et afatinib (ITK irréversibles).

8.1.1. Mécanismes de résistance primaire aux ITK anti-EGFR

La résistance primaire caractérise les patients réfractaires d'emblée au traitement. En effet, environ 30% des patients porteurs d'un adénocarcinome muté *EGFR* ne répondent pas au traitement par ITK (Rosell *et al.*, 2012 ; Jackman *et al.*, 2010). Les causes de résistance primaire sont multiples. Les insertions sur l'exon 20 d'*EGFR* ou certaines mutations ponctuelles sur l'exon 20, comme la p.V769L, la p.N771T et la p.T790M sont associées à une résistance primaire aux ITK (Kancha *et al.*, 2009). Les autres mécanismes de résistance primaire sont liés à la présence de mutations sur d'autres gènes intervenant sur la même voie de signalisation qu'*EGFR* comme *KRAS*, *PIK3CA*, *BRAF*, *ALK* et *HER2* (Ladanyi and Pao, 2008 ; Pao *et al.*, 2005).

8.1.2. Mécanismes de résistance secondaire aux ITK anti-EGFR

Presque tous les patients traités et initialement répondeurs aux ITK vont progresser 6 à 18 mois après le début du traitement (Johnson and Jänne, 2005 ; Sequist *et al.*, 2008 ; Rosell *et al.*, 2009 ; Mok *et al.*, 2009). Une partie de ces résistances secondaires s'explique par des mécanismes génétiques, comme l'apparition de nouvelles mutations sur le gène *EGFR* ou sur un autre gène, mais également par des changements phénotypiques des tumeurs (Figure 15). Il convient de rappeler qu'il faut d'abord éliminer une inefficacité thérapeutique liée à un faible dosage sérique des ITK avant de rechercher une cause de résistance secondaire. Dans le cas contraire, les mécanismes de résistance aux ITK sont la mutation p.T790M sur *EGFR*, l'amplification du gène *MET*, les mutations du gène *PI3KCA*, la transformation en carcinome à petites cellules, et la transition épithélio-mésenchymateuse (Sequist *et al.*, 2011).

La mutation p.T790M : la présence de cette mutation explique plus de 50% des causes de résistance secondaire aux ITK, cette mutation se situe sur l'exon 20 d'*EGFR* (Kobayashi *et al.*, 2005 ; Pao *et al.*, 2005 ; Balak *et al.*, 2006). Il s'agit d'une substitution d'une thréonine par une méthionine en position 790. Cette mutation restaure l'affinité du récepteur pour l'ATP

(Yun *et al.*, 2008). L'utilisation d'ITK de seconde génération comme l'afatinib ou le dacomitinib chez des patients ayant acquis une p.T790M montre qu'il n'existe pas de bénéfice en terme de survie globale mais un bénéfice sur la survie sans progression (Moran and Sequist, 2012 ; Miller *et al.*, 2012 ; Jackman *et al.*, 2010). En revanche, l'utilisation de l'afatinib couplé à un anticorps monoclonal dirigé contre EGFR (cetuximab) semble montrer une efficacité avec des réponses partielles chez les patients ayant une mutation p.T790M (Matar *et al.*, 2004 ; Huang *et al.*, 2004 ; Janjigian *et al.*, 2011).

L'amplification du gène *MET* (mesenchymal epithelial transition growth factor ou hepatocyte growth factor receptor) : le deuxième mécanisme de résistance secondaire le plus fréquent est l'apparition d'une amplification du gène *MET* rapporté dans 5 à 20 % des cas (Engelman *et al.*, 2007 ; Bean *et al.*, 2007 ; Turke *et al.*, 2010). Le gène *MET* est situé sur le même chromosome que le gène *EGFR* en 7q21, il code également pour un récepteur tyrosine kinase dont le ligand est l'hépatocyte growth factor. Sa dimérisation avec ERBB3 permet l'activation des mêmes voies de signalisation que celles activées par l'EGFR, en particulier PI3K/AKT, permettant ainsi d'activer cette voie même lorsqu'EGFR est inhibé par l'ITK. Des études ont montré que l'amplification de *MET* peut être associée à la p.T790M (Bean *et al.*, 2007 ; Suda *et al.*, 2010). Les amplifications de *MET* peuvent également survenir chez les patients non traités par ITK anti-EGFR, elles ont été retrouvées dans environ 1% des adénocarcinomes et 6% des carcinomes épidermoïdes pulmonaires (Go *et al.*, 2010 ; Beau-Faller *et al.*, 2008), il semblerait qu'elles soient associées à un mauvais pronostic (Cappuzzo *et al.*, 2009). L'étude PROFILE 1001 a montré une efficacité du crizotinib (inhibiteurs de plusieurs récepteurs à tyrosine kinase ALK, MET et ROS1) chez les patients porteurs d'une amplification de *MET* *de novo*. L'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-MET (MetMab ou onartuzumab) empêchant la fixation du ligand (Hepatocyte Growth Factor) a montré une bonne efficacité en terme de survie sans progression et de survie globale dans des études de phases 1 et 2 menées dans les CBPNPC de stade avancé, amplifiés *MET*, en association avec l'erlotinib en deuxième ou troisième ligne de traitement (Spigel *et al.*, 2012).

Le changement phénotypique en carcinome à petites cellules (CPC) : il a été démontré que des tumeurs correspondants avant traitement par ITK à des adénocarcinomes mutés *EGFR*, changent de phénotype et deviennent des carcinomes à petites cellules après traitement, conférant ainsi une résistance aux ITK (Zakowski *et al.*, 2006 ; Sequist *et al.*, 2011). Dans ces cas on retrouve la même mutation *EGFR* dans le CPC. La transformation en CPC peut être associée à l'apparition d'une autre mutation dans le gène *EGFR* (p.T790M) ou dans le gène *PIK3CA* (Sequist *et al.*, 2011) ou à une amplifications de *MET* (Yu *et al.*, 2013). Cette

transformation en CPC nécessite la mise en place d'une nouvelle thérapie par l'association étoposide-cisplatine.

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM): elle correspond à l'acquisition par les cellules épithéliales d'un phénotype mésenchymateux, caractérisé par la perte de certaines caractéristiques épithéliales (perte de la cohésion cellulaire avec perte de la E-cadhérine) et par l'acquisition de caractéristiques mésenchymateuses (capacité de migration, expression de la vimentine). Ce phénomène est essentiel pendant l'embryogénèse. La TEM est connue pour être anormalement réactivée chez l'adulte dans deux types de pathologies : les fibroses tissulaires, en particulier rénales, et les cancers. Elle a été décrite comme une cause de résistance secondaire aux ITK anti-EGFR (Sequist *et al.*, 2011; Thomson *et al.*, 2005 ; Frederick *et al.*, 2007 ; Fuchs *et al.*, 2008 ; Rho *et al.*, 2009). Comme dans les CPC, malgré le changement phénotypique, ces cellules de type mésenchymateux gardent la mutation *EGFR* détectée primitivement avant le changement phénotypique.

D'autres mutations ont été décrites comme causes de résistances secondaires mais elles sont plus rares : les mutations de la *PIK3CA* (Sequist *et al.*, 2011), ou de *BRAF* (Ohashi *et al.*, 2012), l'activation de *IGFRI* (insulin growth factor receptor) et les pertes de *PTEN* (Sharma *et al.*, 2007; Guix *et al.*, 2008 ; Yamasaki *et al.*, 2007). Cependant, il reste encore environ 30 % de cause de résistance secondaire non connues (Figure 15).

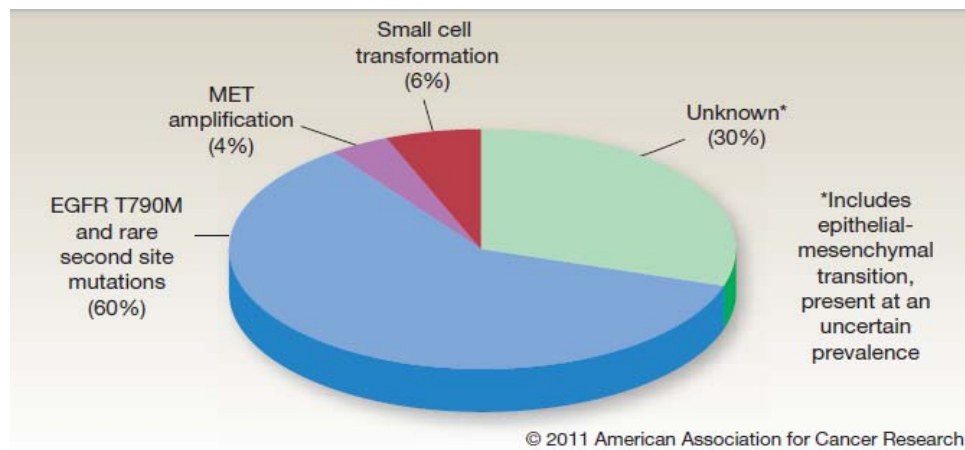


FIGURE 15 : REPRESENTATION DES DIFFERENTS MECANISMES DE RESISTANCE SECONDAIRE AUX ITK ANTI-EGFR

Environ 30 % des cas ont un mécanisme encore inconnu ou incertain comme la transition épithélio-mésenchymateuse. Les mutations rares comme celle des gènes *PIK3CA*, *BRAF* ne figurent pas car leur prévalence est incertaine mais probablement autour de 1%. Ces données sont issues de plusieurs études (Arcila *et al.*, 2011 ; Sequist *et al.*, 2011 ; Oxnard *et al.*, 2011).

La stratégie thérapeutique à adopter chez les patients ayant acquis une résistance aux ITK anti-EGFR est encore sujet à controverse. Les oncologues ont pour habitude de stopper un

traitement lorsque la maladie progresse. Dans le cas des ITK anti-EGFR, l'arrêt des ITK peut être responsable de l'explosion de la maladie. Chaft *et al* retrouve une progression rapide conduisant à une hospitalisation chez 22% de leurs patients qui ont arrêtés les ITK (Chaft *et al.*, 2011). Des études prospectives sont en cours pour évaluer la faisabilité d'associer une chimiothérapie conventionnelle aux ITK ([NCT01544179](#), [NCT01310036](#)). D'autre part, certaines études ont démontré que des périodes de latence sans ITK pouvaient améliorer la sensibilité au ITK anti-EGFR après la reprise du traitement (Watanabe *et al.*, 2011 ; Oxnard *et al.*, 2011). D'ailleurs, une étude basée sur l'évaluation scannographique et par tomographie par émission de positron effectuée avant l'arrêt, 3 semaines après l'arrêt et 3 semaines après la reprise de l'ITK montre que le volume tumoral et le métabolisme glucidique augmentent après l'arrêt puis stagnent en plateau après la reprise (Riely *et al.*, 2007). L'utilisation d'ITK irréversible de seconde génération chez ces patients résistants aux ITK de première génération est décevante (Miller *et al.*, 2012).

8.2. Les thérapies ciblées anti-ALK

Les patients présentant un carcinome pulmonaire réarrangé *ALK* ne montrent pas de réponse thérapeutique après traitement par ITK anti-EGFR (Shaw *et al.*, 2009) ; en revanche, ils présentent une réponse importante aux ITK anti-ALK. Les inhibiteurs d'ALK conduisent à une apoptose *in vitro* et une diminution du volume tumoral *in vivo*, témoignant du phénomène d'addiction oncogénique (Koivunen *et al.*, 2008). Le crizotinib (PF-02341066, Pfizer) est un inhibiteur d'ALK, il agit sur le domaine tyrosine kinase en entrant en compétition avec l'ATP ce qui l'empêche d'être phosphorylé et donc d'être activé (Shaw and Solomon, 2011). Il inhibe également les récepteurs MET et ROS1. Il s'agit d'un traitement par voie orale. Dans les deux études de phase 1 (Kwak *et al.*, 2010 ; Camidge *et al.*, 2012), le taux de réponse objective était de 57% et 61% chez les patients porteurs d'un carcinome pulmonaire réarrangé *ALK* (FISH+). Une étude de phase 3 comparant l'effet du crizotinib à celui de la chimiothérapie conventionnelle (pemetrexed ou docetaxel) chez des patients porteurs d'une tumeur réarrangée *ALK* préalablement traités par chimiothérapie à base de sels de platine, a montré un taux de réponse et une survie sans progression meilleurs chez les patients traités par crizotinib (Shaw *et al.*, 2013). En revanche, la survie globale n'est pas améliorée (Shaw *et al.*, 2011). Le taux de cellules réarrangées ne semble pas être corrélé à la réponse au crizotinib (Camidge *et al.*, 2013).

Comme les thérapies ciblées anti-EGFR, les thérapies ciblées anti-ALK induisent une réponse spectaculaire suivie de l'apparition plus ou moins rapide d'une résistance au traitement. Cette résistance secondaire est souvent liée à l'apparition de nouvelles mutations sur le site tyrosine kinase d'*ALK* (p.C1156Y et p.L1196M) ou d'amplifications d'*ALK* (Katayama *et al.*, 2012 ; Doebele *et al.*, 2012). L'utilisation d'inhibiteurs d'ALK de deuxième génération ou d'inhibiteurs de HSP90 pourrait être une solution thérapeutique (Gridelli *et al.*, 2013).

8.3. Les autres thérapies ciblées

8.3.1. Thérapies ciblant les tumeurs *KRAS* mutées

Aucune molécule inhibant *KRAS* n'a d'AMM dans le carcinome pulmonaire, cependant plusieurs agents thérapeutiques pourraient avoir un effet bénéfique comme les inhibiteurs de la farnesyl transférase, les inhibiteurs de MEK, les inhibiteurs de mTOR ou les inhibiteurs de HSP90.

Les inhibiteurs de la farnesyl transférase : l'activation de la voie de signalisation cellulaire RAS/RAF/MAPK nécessite l'ancrage de RAS activé à la face interne de la membrane cellulaire. L'ajout d'un groupe farnesyle en C-terminal à RAS grâce à la farnesyl transférase est nécessaire à cet ancrage membranaire. Après un début prometteur de l'utilisation des inhibiteurs de la farnesyl transférase (salirasib) *in vitro*, son utilisation dans un essai clinique chez 30 patients porteurs d'un CBPNPC mutés *KRAS* n'a malheureusement pas montré de réponse significative (Riely *et al.*, 2011).

Les inhibiteurs de MEK : RAS active la voie MEK-ERK, l'utilisation d'inhibiteur de MEK (selumetinib) diminue la prolifération cellulaire dans des lignées cellulaires *KRAS* mutées (Dry *et al.*, 2010) et réduit le volume tumoral chez des modèles de souris atteintes d'un CBPNPC *KRAS* muté (Chen *et al.*, 2012). Une phase 2 comparant docetaxel+selumetinib versus docetaxel seul chez des patients porteurs d'un CBPNPC *KRAS* muté a montré une augmentation, non significative cependant, de la survie globale, une augmentation significative de la survie sans progression et un meilleur taux de réponse chez les patients traités par selumetinib (Jänne *et al.*, 2013). Une étude randomisée avec un nouvel inhibiteur de MEK (GSK110212) est en cours chez des patients *KRAS* mutés.

Les inhibiteurs de mTOR : mTOR est une sérine thréonine kinase intervenant dans la voie de signalisation cellulaire PI3K/AKT. L'utilisation d'inhibiteur de m-TOR (ridaforolimus) chez deux patients présentant un CBPNPC *KRAS* muté a montré une réponse partielle améliorant la survie sans progression (Seki *et al.*, 2012).

Les inhibiteurs de HSP90 : des études précliniques avaient montré une efficacité des inhibiteurs de HSP90 (heat shock proteins 90) dans des lignées cellulaires et des modèles d'animaux porteurs d'une tumeur *KRAS* mutée (Acquaviva *et al.*, 2012). Malheureusement l'utilisation du ganetespib dans une étude de phase 2 n'a pas montré d'amélioration de la survie sans progression chez les patients porteurs d'une tumeur *KRAS* mutée (Socinski *et al.*, 2013).

8.3.2. Thérapies ciblant les tumeurs *BRAF* mutées

Il a été rapporté que le vemurafinib, inhibiteur de la sérine thréonine kinase BRAF, déjà utilisé dans le traitement des mélanomes, a un effet bénéfique sur les adénocarcinomes pulmonaires mutés *BRAF* (Gautschi *et al.*, 2012).

8.3.3. Thérapies ciblant les tumeurs *HER2* mutées

Les données de la littérature concernant les effets thérapeutiques des anti-HER2 sont rares. Les plus prometteurs sont les inhibiteurs de tyrosine kinase irréversibles anti-EGFR et anti-HER2 comme le neratinib (HKI-272), le dacomitinib (PF-00299804), et l'afatinib (BIBW-2992). L'afatinib utilisé en monothérapie montre une réponse partielle chez 2 patients sur 5 porteurs d'un adénocarcinome muté *HER2* (De Grève *et al.*, 2012). Il existe quelques cas rapportés de réponse à la combinaison trastuzumab-paclitaxel/ou vinorelbine chez les patients porteurs d'un CBPNPC mutés *HER2* (Cappuzzo *et al.*, 2006) (Tomizawa *et al.*, 2011). Des essais cliniques sont en cours pour l'utilisation du trastuzumab plus ou moins associé au carboplatine et paclitaxel chez les patients possédant une tumeur soit amplifiée soit mutée *HER2* (protocoles NCT00004883 et NCT00758134).

9) Système immunitaire et cancer

9.1. Les origines de l'immunité anti-tumorale

En 1890, William B. Coley émet l'idée que le système immunitaire pourrait contrôler la progression tumorale. En effet, ce chirurgien avait observé une régression tumorale concomitante à un érysipèle chez un des patients porteur d'un ostéosarcome. Il avait alors reproduit l'expérience en injectant un streptocoque chez un second patient présentant un cancer laryngé inopérable et avait de nouveau observé une régression tumorale associée à la réaction inflammatoire (Coley, 1893). En 1909, Paul Ehrlich propose également l'idée que le système immunitaire pourrait contrôler la prolifération de cellules cancéreuses (Ehrlich, 1909) et à la fin des années 1950, Macfarlane Burnet et Lewis Thomas proposent l'hypothèse de l'immunosurveillance des tumeurs (Burnet, 1957 ; Thomas, 1959). Burnet supposait que l'instabilité génétique observée dans les cellules tumorales devait être à l'origine de la génération d'antigènes capables d'être reconnus comme étrangers par le système immunitaire (Burnet, 1967). Ce n'est que dans les débuts des années 1990 que les premiers antigènes tumoraux ont été décrits (Tumor-Associated Antigens, TAA) (van der Bruggen *et al.*, 1991), ouvrant le champs à de nouvelles perspectives thérapeutiques. Ces antigènes tumoraux ont été décrits comme étant des petits peptides de 8 à 10 acides aminés apprêtés par la cellule tumorale à partir de protéines surexprimées ou mutées puis présentés à leur surface par les molécules de classe I du CMH et reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques (Knutson and Disis, 2005).

Chez l'Homme, il existe de nombreuses observations témoignant de l'effet anti-tumoral des cellules immunitaires. En effet, il est connu que la présence d'une immunodéficience prédispose au cancer, c'est le cas des patients au stade SIDA ou traités par immunosuppresseurs qui développent des cancers, le plus souvent viro-induits, par exemple des sarcomes de Kaposi liés au virus de l'herpès de type 8 (HHV8), des lymphomes liés au virus d'Epstein Barr (EBV) et des cancers du col de l'utérus liés au papillomavirus (HPV) (Adami *et al.*, 2003; Hollenbeak *et al.*, 2005). De plus, on sait que certains patients transplantés, traités par immunosuppresseurs, ont développé des cancers de mêmes types histologiques que des cancers présents antérieurement chez les donneurs considérés comme guéris au moment de la transplantation. Ceci suggère que les cellules tumorales latentes chez le donneur, et contrôlées par le système immunitaire, se sont remises à proliférer chez le receveur sous l'effet de l'immunosuppression (Elder *et al.*, 1997). Enfin, un grand nombre

d'études ont rapporté des associations significatives entre le degré d'infiltration de certaines cellules immunitaires - notamment les lymphocytes - et un pronostic de survie favorable chez ces patients (Fridman *et al.*, 2012). Ce point sera détaillé plus loin.

9.2. Les acteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale

La réponse immunitaire fait intervenir deux systèmes de défense : **la réponse innée non spécifique** constituant la première ligne de défense et **la réponse adaptative spécifique** impliquant les réponses à médiation humorale et à médiation cellulaire. Les cellules immunitaires qui composent la réponse innée sont les monocytes/macrophages, les cellules NK et les polynucléaires alors que les lymphocytes B et T composent la réponse adaptative. Le déclenchement de la réponse adaptative nécessite une rencontre du lymphocyte avec l'antigène. L'activation du lymphocyte est conditionnée par l'interaction entre le TCR et l'antigène, lui-même présenté par une cellule présentatrice d'antigène (APC) via le CMH (complexe majeur d'histocompatibilité). Les APC sont représentées essentiellement par les monocytes/macrophages, les lymphocytes B et les cellules dendritiques matures. Ces dernières sont cependant connues pour être les plus puissantes APC, ce qui situe ces cellules à l'interface entre l'immunité innée et adaptative.

9.2.1. Les cellules du système immunitaire inné

Il existe de nombreuses cellules du système immunitaire inné, nous allons présenter uniquement les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules natural killer.

Les cellules dendritiques (CD) : elles ont été décrites en 1868 par Paul Langerhans au niveau de l'épiderme. C'est Steinman et Cohn en 1973 qui les nommèrent cellules dendritiques (Steinman and Cohn, J Exp Med 1973). Les CD proviennent de précurseurs de la moelle osseuse myéloïde, communs aux cellules dendritiques, cellules granulocytaires et macrophagiques qui vont se différencier en CD grâce à des facteurs de croissance comme le GM-CSF (Banchereau and Steinman, 1998) (Steinman and Banchereau, 2007) (Gabrilovich, 2004). Les cellules dendritiques immatures, ont la capacité de phagocyter les antigènes et de migrer vers les organes lymphoïdes où elles acquièrent leur maturité. Elles sont également retrouvées dans les **structures lymphoïdes tertiaires**, décrites dans le microenvironnement des tumeurs, en particulier des carcinomes pulmonaires, comme nous le décrirons plus loin. La maturation se traduit par une surexpression des CMH de classe I et II et une surexpression des molécules de co-stimulation impliquées dans l'activation des LT comprenant notamment

CD40, CD80, CD83 et CD86. Les cellules dendritiques matures ne peuvent plus phagocyter, mais elles expriment à leur surface les épitopes antigéniques qui seront reconnus par les lymphocytes. Les cellules dendritiques matures expriment la molécule **DC-LAMP** (dendritic cell-lysosomal associated membrane protein) qui est une glycoprotéine transmembranaire, dont l'expression est restreinte aux DC matures et aux pneumocytes de type II (Salaun *et al.*, 2004). Les CD matures ont 3 fonctions principales : -1- le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative grâce à la présentation antigénique aux lymphocytes T ; -2- la tolérance au « soi » impliquant les lymphocytes T dits de sélection négative, dans le thymus ; -3- l'orientation des lymphocytes T vers une différenciation spécifique (essentiellement les réponses Th1, Th2 ou Treg) grâce à la sécrétion de différentes cytokines. **La réponse Th1 ou réponse à médiation cellulaire** est mise en place lorsque les cellules dendritiques sécrètent de l'interleukine-12 (IL-12), ce qui permet aux lymphocytes T CD4+ naïfs de se différencier en cellules Th1 productrices d'interféron gamma (IFN- γ) ; permettant par exemple de combattre des pathogènes intracellulaires tels que les virus et les bactéries. Les CD interviennent également dans la réponse anti-tumorale. Les CD matures présentent les peptides exogènes en association avec des molécules CMH de classe II aux lymphocytes T CD4+ et présentent les peptides endogènes en association avec les molécules CMH de classe I aux lymphocytes T CD8+. Des vaccins basés sur l'utilisation de cellules dendritiques ont été développés pour traiter certains cancers (Palucka and Banchereau, 2012). **La réponse Th2 ou réponse à médiation humorale** est favorisée par l'absence d'IL-12. Les lymphocytes Th2 sécrètent de l'IL-4, IL-5 et IL-13, coopèrent avec les lymphocytes B et favorisent leur différenciation en plasmocytes, la maturation d'affinité des immunoglobulines et la commutation de classe. Les lymphocytes de type Th2, sont majoritairement impliqués dans les réponses lymphocytaires B contre les pathogènes extracellulaires. **La réponse Treg** est une réponse régulatrice au cours de laquelle les lymphocytes T naïfs se différencient en T régulateurs spécifiques d'un antigène et développent une activité inhibitrice de la réponse à cet antigène.

Les macrophages : ils ont été décrits à la fin du 19^{ème} siècle par Elie Metchnikoff. Les macrophages sont des monocytes qui ont quitté le sang par extravasation et atteints les tissus. Il existe 2 sous-types de macrophages, les macrophages M1 qui sont induits par l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-12 ; les macrophages M2 induits par les cytokines l'IL-4 et l'IL-13 ; enfin, les macrophages M2-like induits par des complexes immuns, l'IL-1 β , l'IL-10 ou le TGF- β . De manière simpliste, on attribue aux macrophages de type M1, un rôle dans l'élimination et le

contrôle des tumeurs, tandis qu'on attribue un rôle pro-tumoral aux macrophages de type M2 ou M2-like (Pollard, 2004).

Les cellules natural killer (NK): ces cellules ont été décrites en 1975 (Herberman *et al.*, 1975). Elles dérivent de précurseurs lymphoïdes de la moelle osseuse. Ce sont des lymphocytes non T et non B qui n'expriment ni le CD3, ni le CD19, ni le BCR ni le TCR. Elles sont caractérisées par l'expression des molécules CD56, CD16 (récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines : Fc γ R1IA) et NKp46. Elles ont été décrites pour jouer un rôle dans le contrôle précoce des infections virales, l'immunosurveillance des tumeurs, le rejet de greffe de moelle osseuse ou encore l'équilibre des interactions mère/fœtus durant la grossesse (Vivier *et al.*, 2008). La quantité de cellules NK est variable entre chaque individu (Grégoire *et al.*, 2007). Les cellules NK arrivent à reconnaître leur cible grâce à la présence sur leur membrane cellulaire de récepteurs activateurs ou inhibiteurs. La lyse cellulaire ne se produira que si les signaux d'activation surpassent les signaux d'inhibition. Le principal signal inhibiteur est produit par les récepteurs KIR (killer cell Ig-like receptor), portés par les NK, qui reconnaissent les molécules du CMH de classe I. L'activation d'un seul type de récepteur KIR suffit à empêcher la mort cellulaire alors qu'il faut toujours plusieurs signaux activateurs différents pour provoquer la mort de la cellule cible. Ce système permet donc en pratique aux cellules NK de lyser toutes les cellules dépourvues des molécules du CMH de classe I ou de classe I différente. Les cellules NK peuvent lyser les cellules cibles soit en exerçant des fonctions de cytotoxicité directe (sécrétion de granules lytiques cytoplasmiques : perforine ou granzyme), ou dépendante des anticorps (ADCC, antibody dependant cell cytotoxicity), ou bien par la production de cytokines, comme l'IFN- γ . Le rôle des cellules NK dans l'immunosurveillance des tumeurs a été largement décrit, l'activation des cellules NK fait suite à une perte d'expression des molécules de CMH de classe I par les cellules tumorales, ou à une reconnaissance de ligands activateurs exprimés par la cellule transformée (Vivier *et al.*, 2012). Dans notre équipe, nous avons démontré qu'au sein des carcinomes pulmonaires, les cellules NK ont un phénotype et des fonctions altérés ce qui pourrait expliquer leur incapacité à reconnaître et/ou à éliminer les cellules tumorales (Platonova *et al.*, 2011).

9.2.2. Les cellules du système immunitaire adaptatif

Les lymphocytes T (LT): ce sont des acteurs majeurs de la réponse immunitaire, ils sont différenciés, éduqués et sélectionnés dans le thymus, d'où leur nom de lymphocyte T. Cette sélection thymique se fait d'abord par une sélection positive qui a lieu dans le cortex thymique puis par une sélection négative qui se déroule dans la médullaire thymique

(Blackburn and Manley, 2004). La sélection positive permet aux lymphocytes qui ont reconnu les antigènes présentés par les molécules du CMH avec suffisamment d'affinité, de recevoir un signal de survie alors que les autres meurent par apoptose. Au contraire, la sélection négative permet d'éliminer les lymphocytes qui interagissent trop fortement avec les auto-antigènes. Tous les lymphocytes T expriment le marqueur membranaire CD3 et le récepteur membranaire (TCR) constitué de deux chaînes, le plus souvent α et β , plus rarement γ et δ . Les lymphocytes T sont des cellules capables d'induire une réponse immunitaire suite à la reconnaissance, par leur récepteur membranaire T (TCR), d'un peptide antigénique présenté via le CMH exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes (Germain, 1994). Le complexe moléculaire CD3/TCR est nécessaire à la transduction du signal d'activation pour les lymphocytes T (Weiss and Littman, 1994)

Il existe plusieurs types de lymphocytes T :

- Les lymphocytes T cytotoxiques (CD8)
- Les lymphocytes T auxiliaires (CD4)
- Les lymphocytes T régulateurs (Treg)
- Les lymphocytes NKT présentant des marqueurs de cellule T comme le CD3 et des marqueurs de cellules NK.

Nous allons maintenant présenter plus en détail les cellules T CD4⁺ et les cellules T CD8⁺.

Les lymphocytes T CD4⁺ (ou lymphocytes auxiliaires « helper ») sont des cellules dont les principales fonctions sont de recruter et d'activer de nombreuses cellules immunitaires effectrices. Aussi, elles occupent une place centrale dans la mise en place des réponses cellulaires et humorales. Sous l'action de différentes cytokines, les lymphocytes CD4⁺ naïfs vont se différencier en différentes sous-populations effectrices appelées **T helper de type 1 (Th1)**, **T helper de type 2 (Th2)**, **T helper de type 17 (Th17)** et **T régulateurs (Treg)** (Mosmann *et al.*, 1986) (Nurieva and Chung, 2010) (Steinman, 2007). Ces sous-types sont définis en fonction des cytokines qu'elles produisent et de leurs fonctions. Sous l'action de l'interleukine 12 (IL-12), les LT naïfs Th0 se différencient en Th1 producteur d'interféron-gamma (IFN- γ), d'IL-2 et de tumor necrosis factor α (TNF- α). Sous l'action de l'IL-4, les LT naïfs se différencient en Th2 et produisent de l'IL-4, -5, -6, -10, -13 et -24. En présence de tumor growth factor beta (TGF- β) et d'IL-6, les Th0 se différencient en Th17 producteurs d'IL-17A, -17F, -21, -22, -10 et de TNF- α . Enfin, le TGF- β permet la différenciation des cellules T naïves en Treg qui produisent de l'IL-10 et -13 et du TGF- β . Le développement de ces sous-populations est mutuellement exclusif, le développement des Th1 inhibe le

développement des Th2 et inversement. Les lymphocytes Th17 coordonnent les réponses immunitaires innées et adaptatives et pourraient également avoir un rôle dans l'inhibition de la réponse anti-tumorale (Sakaguchi *et al.*, 2001).

Les lymphocytes T CD8⁺ (ou cytotoxique) ont été décrits à la fin des années 1960 (Brunner *et al.*, 1968). Ils sont activés par des cellules présentatrices d'antigène (CPA) présentant l'antigène par une molécule de CMH de classe I. Après être activés, ils peuvent lyser leurs cellules cibles par libération d'enzyme (perforine, granzyme).

Le développement d'une réponse immunitaire antigène spécifique fait intervenir des signaux immunomodulateurs. L'activation des lymphocytes T naïfs nécessite trois signaux. Le **premier signal** correspond à l'interaction entre le TCR et le complexe peptide-CMH de la cellule présentatrice, correspondant le plus souvent à la cellule dendritique mature. Un **deuxième signal de costimulation** est nécessaire pour poursuivre cette activation spécifique et protéger les cellules T d'une anergie. Ce deuxième signal fait intervenir les molécules CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) exprimées à la surface des cellules dendritiques matures, reconnues par CD28 exprimé à la surface des lymphocytes T. Lorsque l'activation des lymphocytes T s'est établie, elle nécessite un rétrocontrôle par des signaux inhibiteurs afin d'empêcher une prolifération incontrôlée. Ces signaux inhibiteurs passent par des récepteurs inhibiteurs comme CTLA-4, PD1, TIM-3 et LAG-3. CTLA4 (« cytotoxic T lymphocyte antigen »), est une molécule qui se lie à CD80/CD86, comme CD28. PD1 (« programmed cell death-1 ») est exprimée après CTLA-4 et reconnue par deux ligands (PDL-1 et PDL-2). Le **troisième signal** correspond à la prolifération des lymphocytes et à leur **différenciation fonctionnelle** qui fait intervenir la molécule mTOR (« mammalian target of rapamycin »). Dans les carcinomes pulmonaires, il a été montré que les cellules immunitaires intra-tumorales pouvaient exprimer PD-1 (Zhang *et al.*, 2010) et qu'environ 50% des CBPNPC exprimaient PDL-1 (Mu *et al.*, 2011). La surexpression de PDL-1 a été décrite comme un des mécanismes d'échappement de la cellule tumorale au système immunitaire.

Plusieurs essais cliniques utilisant ces molécules immunosuppressives, ont été développés dans les CBPNPC. Un essai de phase 2, comparant l'utilisation d'un anti-CTLA4 (ipilimumab) à une chimiothérapie (carboplatine + paclitaxel) a montré un bénéfice en terme de survie sans progression, avec une efficacité qui semblait plus prononcée dans les carcinomes épidermoïdes (Lynch *et al.*, 2012). Deux études de phase 1 ont montré l'intérêt de l'utilisation des anticorps monoclonaux anti-PD-1 et anti-PDL-1 dans des CBPNPC de stades avancés (Topalian *et al.*, 2012 ; Brahmer *et al.*, 2012). Dans ces études, les tumeurs exprimant

PD-L1 avaient une meilleure réponse au traitement par anti-PD1 ou anti-PDL-1, que celles qui ne l'exprimaient pas.

Les lymphocytes B (LB) : ils sont responsables de la réponse immunitaire humorale grâce aux anticorps qu'ils produisent lorsqu'ils sont au stade plasmocyte, suite à leur rencontre avec un antigène et leur activation (Shapiro-Shelef and Calame, 2005). Les lymphocytes B jouent également le rôle de cellules présentatrices d'antigènes (Rivera *et al.*, 2001). Les lymphocytes B résident majoritairement dans la rate, les ganglions et le sang, mais également au niveau des structures lymphoïdes tertiaires (Carragher *et al.*, 2008 ; Thauvat *et al.*, 2005). Les LB sont fréquemment retrouvés au sein des tumeurs (Nielsen and Nelson, 2012) cependant leur rôle dans l'immunité anti-tumorale est très controversée, certains montrant un effet protumoral (Shah *et al.*, 2005) et d'autre un effet anti-tumoral (DiLillo *et al.*, 2008). Notre équipe a démontré que la présence de nombreux follicules lymphoïdes B, formant les structures lymphoïdes tertiaires, dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules, était associée à un bon pronostic. De plus, la combinaison d'une forte densité en follicules lymphoïdes et d'une forte densité en cellules dendritiques matures, situés le plus souvent dans les follicules lymphoïdes, représentait un puissant biomarqueur pronostique dans les carcinomes pulmonaires de tous stades (Germain *et al.*, 2014).

9.3. La réponse immunitaire anti-tumorale ou théorie des 3E: Elimination, Equilibre, Echappement

Même si des rémissions spontanées ont été décrites dans certains cancers (mélanome, cancers du rein) (Mackensen *et al.*, 1994) (Selli *et al.*, 1988), l'incidence élevée des cancers souligne l'impossibilité du microenvironnement immunitaire à contrôler cette maladie. Ce phénomène est dû aux mécanismes d'échappement que la tumeur développe et au rôle ambivalent pro- et anti-tumoral du système immunitaire. L'équipe de R.D. Schreiber a proposé, en 2002, la théorie de l'immunoédition des tumeurs (ou théorie des 3E) qui comprend 3 phases qui ne sont pas forcément successives : l'élimination, l'équilibre et l'échappement (Dunn *et al.*, 2002) (Dunn *et al.*, 2004) (Schreiber *et al.*, 2011) (Figure 16).

Lors de la première étape d'élimination, les cellules tumorales sont reconnues et éliminées par les cellules du système immunitaire inné et adaptatif. Les cellules tumorales qui sont le moins immunogènes et/ou le plus résistantes à la lyse, émergent et survivent entrant dans une étape d'équilibre pendant laquelle le système immunitaire inné et adaptatif va contrôler la tumeur

sans l'éliminer totalement. Cette phase peut durer plusieurs années comme le suggèrent les données cliniques de patients transplantés. En effet, il a été rapporté que des patients transplantés rénaux avaient développé un mélanome, provenant du donneur et opéré de son mélanome 16 ans avant la transplantation (MacKie *et al.*, 2003). Les cellules tumorales qui ont réussi à échapper au système immunitaire, finissent par proliférer de manière incontrôlée et aboutissent à une tumeur cliniquement observable, c'est la phase d'échappement.

Les mécanismes d'échappement tumoral à l'immunosurveillance sont multiples.

Brièvement, on peut noter dans les mécanismes principaux :

- 1- la faible immunogénicité des tumeurs, par exemple les antigènes tumoraux ne sont pas reconnus par le système immunitaire car ils ressemblent à des molécules du soi ;
- 2- la présentation antigénique peut être déficiente, comme c'est le cas lorsque les cellules tumorales n'expriment pas les molécules du CMH (So *et al.*, 2005) ;
- 3- il peut y avoir une sécrétion de facteurs immunosuppresseurs, comme le TGF β qui inhibe l'activation des cellules NK, ou l'IL10 qui inhibe la différenciation des précurseurs des cellules dendritiques (Dunn *et al.*, 2004) ;
- 4- la tumeur peut produire des molécules inhibant l'apoptose induite par les lymphocytes T grâce à la diminution de l'expression de Fas ou de l'expression de Fas ligand (Fulda, 2010) ;
- 5- la tumeur peut activer des cellules T suppressives comme les lymphocytes T régulateurs (Kerker and Restifo, 2012) ;
- 6- la tumeur peut exprimer des molécules inhibitrices de la réaction immunitaire anti-tumorale comme PD-L1 ;
- 7- enfin, le stroma tumoral, lorsqu'il est composé par une structure fibrillaire dense et linéaire, peut empêcher le recrutement et la migration des cellules immunitaires au sein de la tumeur (Salmon and Donnadieu, 2012).

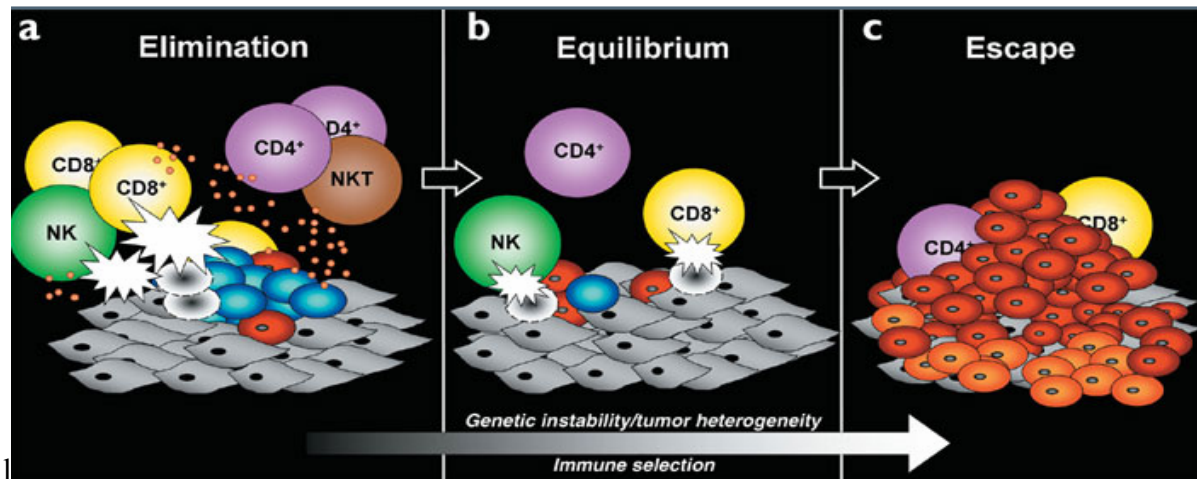


FIGURE 16 : REPRESENTATION DES 3 PHASES DE LA REPOSE IMMUNITAIRE ANTI-TUMORALE
(Dunn *et al.*, 2002)

9.4. Le microenvironnement tumoral

En 2000, Douglas Hanahan et Robert Weinberg décrivaient les 6 caractéristiques majeures des cellules tumorales permettant leur prolifération « The hallmarks of cancer » (Hanahan and Weinberg, 2000). Selon les auteurs, les 6 piliers du cancer (Figure 17) étaient constitués par :

- 1- l'indépendance des cellules tumorales vis-à-vis des signaux de croissance ;
- 2- l'insensibilité aux signaux antiprolifératifs ;
- 3- la capacité à éviter l'apoptose ;
- 4- la capacité à se répliquer indéfiniment ;
- 5- la capacité à induire l'angiogenèse ;
- 6- l'acquisition par les cellules cancéreuses d'un pouvoir invasif aboutissant à la formation de métastases.

Ce n'est qu'en 2011, que ces mêmes auteurs publient un nouvel article « Hallmarks of cancer: the next generation » (Figure 18), où ils identifient deux autres caractéristiques majeures des cellules cancéreuses : l'échappement au système immunitaire et la capacité de reprogrammation du métabolisme énergétique par les cellules tumorales. Ils mettent également en évidence deux facteurs favorisant les cancers : l'inflammation et l'instabilité génomique des tumeurs (Hanahan and Weinberg, 2011). En effet, il a été démontré que la persistance de l'inflammation pouvait endommager le matériel génétique et favoriser des phénomènes de prolifération cellulaire anormale. C'est pourquoi l'inflammation chronique est

considérée comme une condition précancéreuse comme c'est le cas dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, la gastrite chronique ou la cirrhose hépatique (Whiteside, 2008).

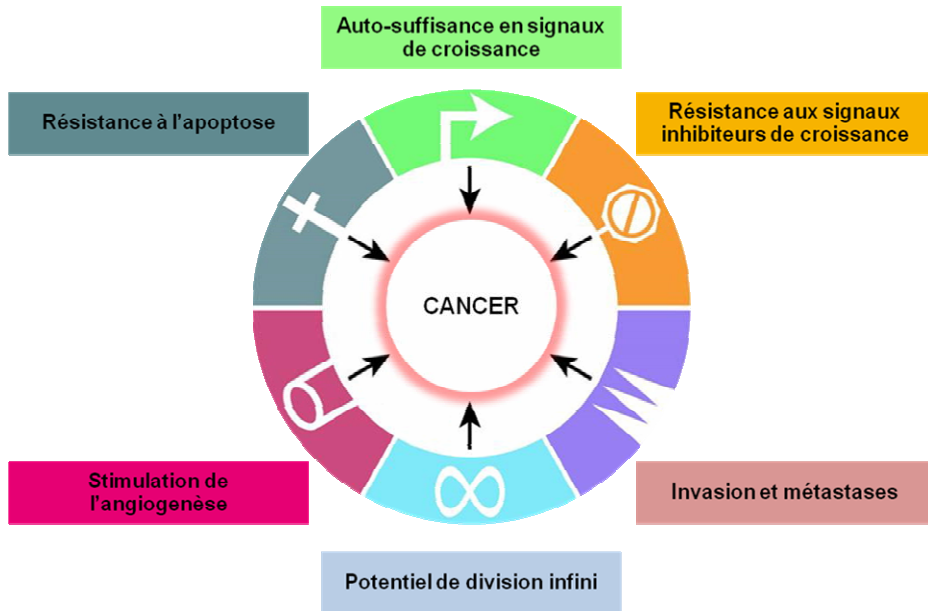


FIGURE 17 : SCHEMA REPRESENTATIF DES SIX CARACTERISTIQUES DES CELLULES TUMORALES
 « The hallmarks of cancer » (Hanahan and Weinberg, 2000).

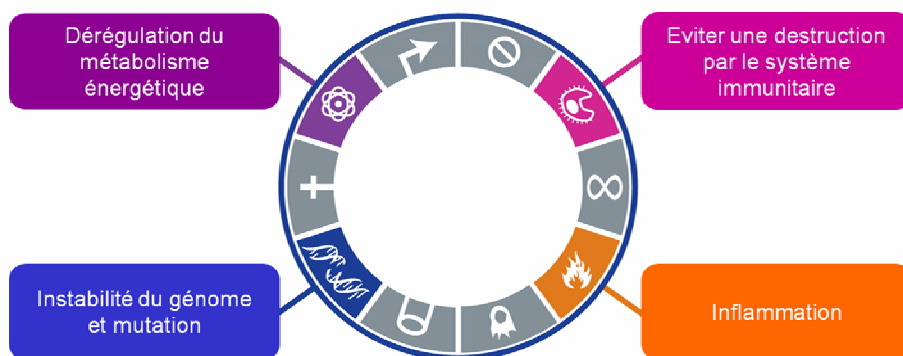


FIGURE 18 : SCHEMA REPRESENTANT LA MISE A JOUR DES PILIERS DU CANCER
 Deux nouvelles caractéristiques des cellules cancéreuses ont été identifiées : la dérégulation du métabolisme énergétique et l'échappement au système immunitaire, ainsi que 2 facteurs favorisant le cancer : l'inflammation et l'instabilité du génome. « Hallmarks of cancer: the next generation » (Hanahan and Weinberg, 2011).

Le microenvironnement des tumeurs est un système complexe et dynamique composé de fibroblastes, de vaisseaux sanguins et lymphatiques, de cellules immunitaires et d'une matrice extracellulaire constituée en particulier de fibronectine et de collagène (Fridman *et al.*, 2012; Hanahan and Weinberg, 2011 ; Hanahan and Weinberg, 2000) (Figure 19). La localisation, le phénotype, l'organisation et le degré d'infiltration des cellules immunitaires peuvent varier d'une manière importante entre les patients pour un même type de tumeur mais aussi en fonction des types de tumeurs (Sautès-Fridman *et al.*, 2011). En effet, dans une tumeur, les cellules immunitaires peuvent être situées dans le centre de la tumeur, soit directement au contact des cellules tumorales soit dans le stroma et/ou bien dans la zone d'invasion de la tumeur, c'est-à-dire à l'interface entre la tumeur et le tissu non tumoral.

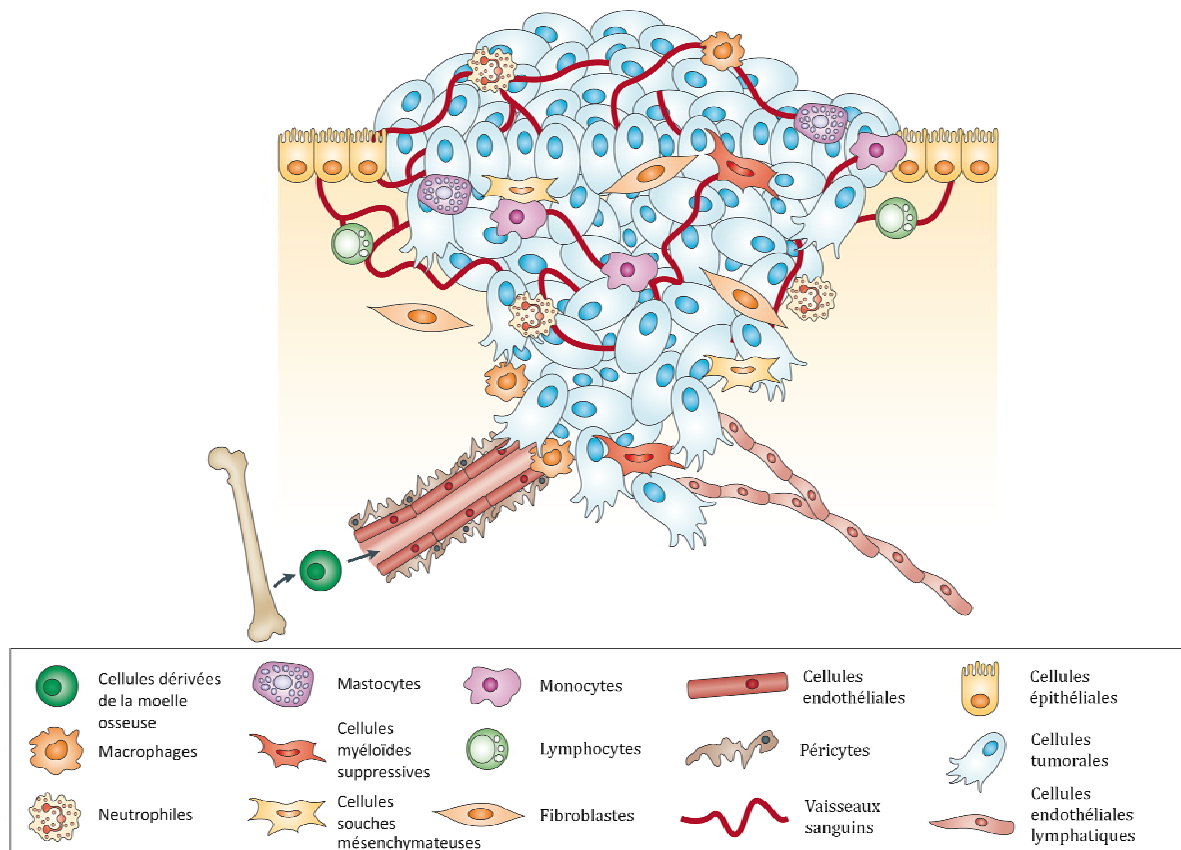


FIGURE 19 : LES DIFFERENTES CELLULES DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL
(Joyce and Pollard, 2009)

9.5. L'organisation de l'infiltrat immunitaire

L'interaction des cellules immunitaires entre elles, est favorisée par son organisation au sein des structures lymphoïdes. Les structures lymphoïdes se divisent en trois grandes catégories : les organes lymphoïdes primaires, les organes lymphoïdes secondaires et les structures lymphoïdes tertiaires. **Les organes lymphoïdes primaires** ou centraux correspondent au thymus et à la moelle osseuse. **Les organes lymphoïdes secondaires** sont constitués d'une part, par les organes encapsulés comme la rate et les ganglions lymphatiques et d'autre part, par les organes non encapsulés appelés tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT) comportant les BALT (Bronchus Associated Lymphoid Tissue) et les GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue, appelés aussi plaque de Peyer). **Les structures lymphoïdes tertiaires** (SLT) ont été décrites par notre équipe en 2008 comme étant présentes dans le microenvironnement des carcinomes pulmonaire non à petites cellules (Dieu-Nosjean *et al.*, 2008) (Figures 20 et 21). Ces structures dynamiques se développent au sein de tissus non-lymphoïdes (Drayton *et al.*, 2006) après la naissance de l'individu, suite à diverses pathologies comme les infections (Shomer *et al.*, 2003), les maladies auto-immunes (Schröder *et al.*, 1996), le rejet de greffe (Thaunat *et al.*, 2005) ou le cancer, elles peuvent disparaître après résolution de l'agent causal. Ces structures lymphoïdes tertiaires ont une structure similaire à celle d'un ganglion lymphatique. En effet, elles sont composées de follicules lymphoïdes B, adjacents à une zone T riche en cellules dendritiques matures DC-LAMP⁺ et entourées de veinules post-capillaires (de Chaisemartin *et al.*, 2011) (Figure 21). Dans le poumon, les structures lymphoïdes tertiaires sont retrouvées dans certaines infections chroniques (aspergillose, tuberculose), dans les bronchopathies chroniques liées au tabac, certaines pneumopathies interstitielles (Hogg *et al.*, 2004) et les carcinomes pulmonaires. Elles peuvent avoir un rôle bénéfique, comme dans les infections où elles permettent d'éradiquer l'agent infectieux ou dans les carcinomes où elles participent à la réponse immunitaire anti-tumorale (Moyron-Quiroz *et al.*, 2004) ; ou à l'inverse, un rôle aggravant, comme dans les pneumopathies interstitielles où elles contribuent à l'apparition de fibrose pulmonaire (Neyt *et al.*, 2012).

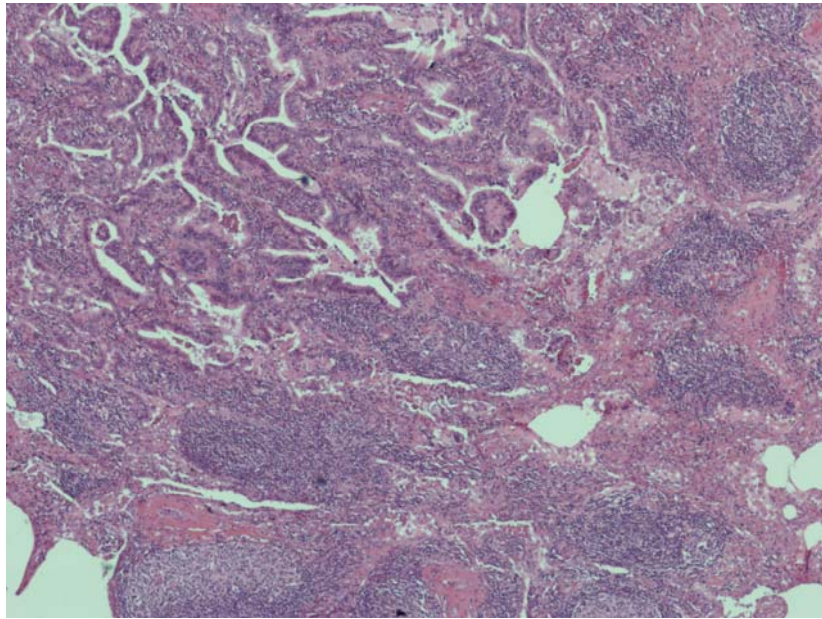


FIGURE 20 : COUPE HES D'UN ADENOCARCINOME PULMONAIRE RICHE EN STRUCTURES LYMPHOÏDES TERTIAIRES

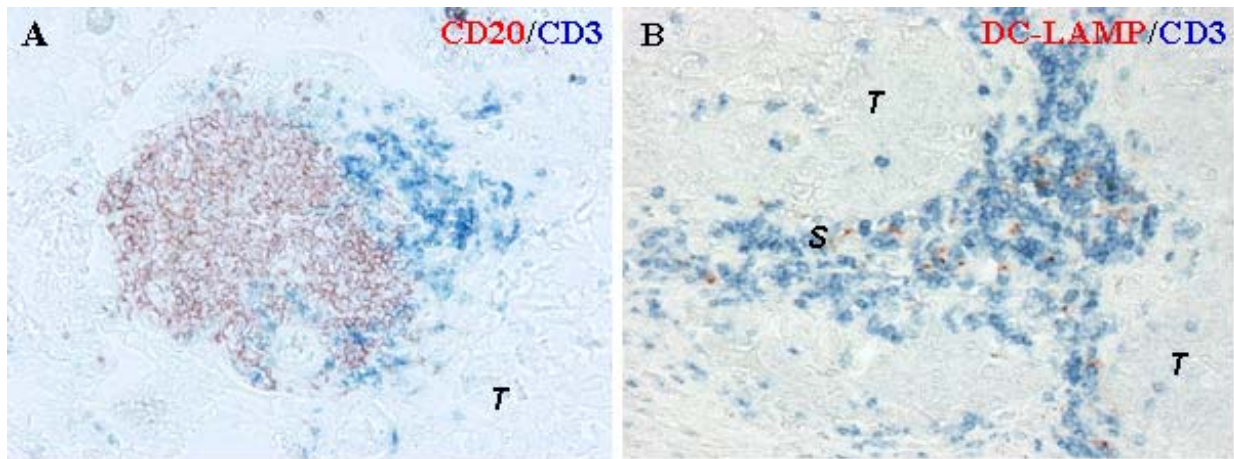


FIGURE 21 : COUPE IMMUNOHISTOCHIMIQUE D'UNE STRUCTURE LYMPHOÏDE TERTIAIRE
 Ces structures sont composées d'une zone riche en LT CD3+, adjacente à un follicule dense en LB CD20+. Des CD DC-LAMP+ matures, sont localisées dans les zones T. Grossissement x 40 T : tumeur, S : stroma

9.6. Le rôle des cellules immunitaires dans le pronostic des tumeurs

La valeur pronostique de l'infiltrat immunitaire dans une tumeur dépend de la nature des cellules immunitaires (caractéristiques phénotypiques), de leur densité et de leur localisation (Galon *et al.*, 2006; Fridman *et al.*, 2012) (Figure 22). La première étude montrant une valeur pronostique de l'infiltrat immunitaire date de la fin des années 1980 et porte sur la présence de lymphocytes T au sein d'adénocarcinomes rectaux (Jass, 1986). Plus tard de nombreuses études ont démontré le rôle protecteur de la présence des lymphocytes T CD8⁺ dans de nombreux cancers, comme les mélanomes (Clark *et al.*, 1989) (Mackensen *et al.*, 1993), les cancers du sein (Marrogi *et al.*, 1997) (Menegaz *et al.*, 2008) (Mahmoud *et al.*, 2011), les cancers de l'ovaire (Zhang *et al.*, 2003) (Sato *et al.*, 2005) (Hamanishi *et al.*, 2007), les cancers de l'endomètre (Kondratiev *et al.*, 2004), les cancers de la vessie (Sharma *et al.*, 2007), les cancers du côlon (Graham and Appelman, 1990) (Pagès *et al.*, 2005) (Galon *et al.*, 2006) (Mlecnik *et al.*, 2011) (Sinicrope *et al.*, 2009) (Tosolini *et al.*, 2011) (Pagès *et al.*, 2009) (Halama *et al.*, 2009) (Diederichsen *et al.*, 2003), et les cancers de prostate (Vesalainen *et al.*, 1994) (Richardsen *et al.*, 2008).

Dans les CBPNPC, environ 2/3 des cellules inflammatoires sont des lymphocytes et parmi ceux-là 80% sont des lymphocytes T (Al-Shibli *et al.*, 2008). La présence de lymphocytes T CD8⁺ est associée à un bon pronostic dans les cancers du poumon, y compris dans les carcinomes à petites cellules (Eerola *et al.*, 2000) (Kataki *et al.*, 2002) (Wakabayashi *et al.*, 2003) (Dieu-Nosjean *et al.*, 2008) (Al-Shibli *et al.*, 2008) (Ito *et al.*, 2005) (Kawai *et al.*, 2008) (Ruffini *et al.*, 2009). Al-shibli *et al* ont également mis en évidence une association entre une forte densité en lymphocytes T CD8⁺ et l'absence d'embols tumoraux vasculaires, suggérant que l'effet pronostique bénéfique pouvait être lié à la suppression des micrométastases (Al-Shibli *et al.*, 2008).

Si pour la plupart des cancers, la densité des cellules immunitaires CD8⁺ mémoires et cytotoxique infiltrant la tumeur est associée à la survie prolongée des patients, il semblerait pourtant que certaines tumeurs échappent à ce dogme. En effet, une forte densité en CD8⁺ est associée à un mauvais pronostic dans le cancer du rein (Nakano *et al.*, 2001) (Remark *et al.*, 2013).

La présence de structures lymphoïdes tertiaires (SLT ou TLS) nommées également Ti-BALT (tumor-induced bronchus associated lymphoid tissue) dans les CBPNPC est associée à un bon pronostic en terme de survie (Dieu-Nosjean *et al.*, 2008 ; Goc *et al.*, 2014). Ces structures sont décrites dans d'autres types de tumeurs solides, où elles sont également associées à un bon

pronostic, comme les adénocarcinomes du côlon (Coppola *et al.*, 2011), les carcinomes mammaires (Martinet *et al.*, 2011) et les mélanomes (Cipponi *et al.*, 2012; van Baren *et al.*, 2013; Elliott *et al.*, 2007).

Certaines équipes, dont celle de J Galon, ont proposé un score immunitaire basé sur la quantification de deux populations immunitaires adaptatives (CD3/CD8, CD3/CD45R0 ou CD8/CD45R0, le CD45R0 détectant les lymphocytes T « mémoires ». Dans le cancer colorectal, ce score immunitaire est pronostique. On l'évalue en quantifiant ces deux marqueurs dans deux régions différentes de la tumeur (le centre de la tumeur et la marge d'invasion). Sa valeur varie de 0 (la densité des 2 types cellulaires est faible dans les 2 régions) à 4. Le score maximum (4) est associé au meilleur pronostic, le score 0 est associé à la survie la plus courte (Galon *et al.*, 2012). Un consortium international, regroupant 16 pays, vise désormais à tester en prospectif, l'intérêt et la faisabilité de ce score immunitaire dans 10 000 cancers colorectaux (Galon *et al.*, 2012).

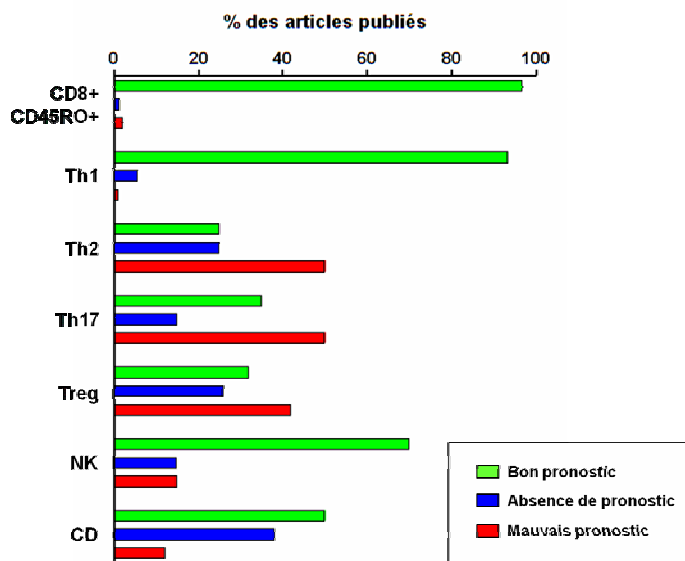


FIGURE 22 : META-ANALYSE DE L'ASSOCIATION ENTRE L'INFILTRAT IMMUNITAIRE ET LE PRONOSTIC DES PATIENTS ATTEINTS DE CANCER

Cette méta-analyse a été faite sur 140 articles publiés entre 1989 à 2011 et portant sur 20 types de cancers différents. Th, T helper ; Treg, T régulateur ; NK, cellule natural killer ; CD, cellule dendritique. D'après Fridman *et al.*, 2012.

OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif de ce travail était d'analyser l'interaction des cellules tumorales avec leur environnement immunitaire dans les carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules. Pour cela, nous avons analysé différentes cohortes de patients atteints de carcinome pulmonaire non à petites cellules.

Dans une première partie, nous avons constitué une cohorte d'adénocarcinomes pulmonaires consécutifs, opérés en monocentrique, dont nous avons recueilli de nombreuses données cliniques et dont les tumeurs ont été réanalysées sur le plan morphologique, moléculaire et immunologique. Ces différentes données ont ensuite été confrontées dans le but de démontrer des associations entre les caractéristiques des cellules tumorales et la présence de cellules immunitaires, et le rôle de chacun dans le pronostic de ces tumeurs.

En parallèle, nous avons également étudié une cohorte d'adénocarcinomes pulmonaires, dans le but de vérifier si la distribution des mutations du gène *EGFR* était homogène au sein d'une tumeur pulmonaire primitive et entre la tumeur primitive et ses métastases ganglionnaires. Ces résultats avaient pour but de valider la détection des altérations du gène *EGFR* en diagnostic de routine à partir de tous types de prélèvements, en particulier dans les prélèvements de petite taille et quel que soit le site, primitif ou métastatique testé.

Dans une deuxième partie, nous avons constitué une cohorte de carcinomes pulmonaires de stade III-N2, traités par chimiothérapie néoadjuvante puis opérés en monocentrique. Nous avons analysé séparément leur réponse pathologique et leur environnement immunitaire, puis leur impact respectif et combiné sur la survie.

PARTIE I : Etude de la valeur pronostique de la classification IASLC/ATS/ERS des adénocarcinomes pulmonaires et corrélation avec le statut mutationnel

Introduction

Les adénocarcinomes pulmonaires sont le type histologique le plus fréquent des carcinomes pulmonaires (Curado MP, 2007). D'après la classification OMS 2004, la majorité des adénocarcinomes est classée mixte car la plupart d'entre eux (80%) possède au moins deux types architecturaux différents (Travis WD, 2004). En 2011, l'International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), l'American Thoracic Society (ATS) et l'European Respiratory Society (ERS) ont proposé une nouvelle classification histologique des adénocarcinomes pulmonaires, basée sur l'identification par méthode semi-quantitative du sous-type histologique prédominant. Cette classification décrit deux nouvelles entités pour les tumeurs ne dépassant pas 3 cm : " l'adénocarcinome *in situ* " (AIS) et " l'adénocarcinome avec invasion minimale " (AIM) dont l'architecture est lépidoïde prédominante associée à un ou plusieurs foyers d'infiltration ne dépassant pas 0.5 cm chacun (Travis *et al.*, 2011). De plus, les adénocarcinomes invasifs sont identifiés selon leur sous-type architectural prédominant comprenant les lépidoïdes, acinaires, papillaires, solides, micro-papillaires, et mucineux. L'intérêt majeur de cette classification est sa valeur pronostique rapportée par plusieurs études (Russell *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2013; Tsuta *et al.*, 2013; Warth *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013; Yoshizawa *et al.*, 2011; Yoshizawa *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). Yoshizawa *et al.* ont identifié 3 groupes pronostiques différents dans une cohorte d'adénocarcinomes de stade I, les adénocarcinomes de bas grade comportant les AIS et les AIM (100% de survie sans maladie à 5 ans); les grades intermédiaires comportant les architectures lépidoïdes, papillaires et acinaires prédominantes (90, 83 et 84% de survie sans maladie à 5 ans, respectivement); et les haut grades avec les adénocarcinomes mucineux, solides et micro-papillaires prédominants (75, 70 et 67% de survie sans maladie à 5 ans, respectivement) (Yoshizawa *et al.*, 2011). La fréquence respective de chacun des sous-types histologiques est hétérogène selon les études, spécialement pour les AIS et AIM. En effet, dans une série caucasienne portant sur 500 patients, ces deux entités ne représentaient que 8 tumeurs alors que dans la population asiatique la fréquence de ces deux entités était de 12% (Yoshizawa *et al.*, 2013). Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette hétérogénéité comme l'ethnicité, la qualité de la détection scannographique et le type de résection chirurgicale. L'origine ethnique peut expliquer cette

hétérogénéité, comme le suggère également les études moléculaires qui retrouvent également des différences de fréquence des mutations *EGFR* entre les patients asiatiques et caucasiens (Couraud *et al.*, 2012). L'amélioration de l'imagerie permet aujourd'hui de mieux détecter les lésions de type "verre dépoli" qui correspondent le plus souvent à des adénocarcinomes précoces (AIS ou AIM), dont le traitement chirurgical probablement le plus adapté est les résections infralobaires (résection atypique ou segmentectomie) (Tsutani *et al.*, 2014; Altorki *et al.*, 2014).

Le but de cette étude est de valider la valeur pronostique de la classification IASLC/ATS/ERS et de corrélérer le grade histologique à plusieurs paramètres cliniques, pathologiques et moléculaires.

Patients et méthodes

Patients

Nous avons réanalysé toutes les tumeurs pulmonaires opérées dans un but curatif, de manière consécutive, dans le service de chirurgie thoracique de l'Hôtel Dieu Paris, pendant la période 2001-2005. Nous avons exclu les patients ayant reçu un traitement néoadjuvant (chimiothérapie et/ou radiothérapie) et ceux traités par résections infra-lobaires. Les caractéristiques cliniques des patients sont décrites dans le Tableau 8. Nous avons conduit cette étude selon les recommandations décrites dans la déclaration d'Helsinki avec l'approbation du comité d'éthique local (CPP Ile de France II, n° 2008-133 and 2012 06-12).

Analyse histologique

Toutes les tumeurs opérées entre 2001 et 2005 ont été réanalysées, les tumeurs qui ne correspondaient pas à un adénocarcinome pulmonaire ont été exclues. Ainsi, nous avons inclus 407 patients opérés d'un adénocarcinome pulmonaire. Toutes les lames tumorales de ces 407 tumeurs ont été revues (1 à 7 par tumeur) indépendamment par deux pathologistes (Diane Damotte et moi-même), dans le but de déterminer l'architecture tumorale prédominante selon la classification IASLC/ATS/ERS. Pour les cas discordants entre les 2 pathologistes (n=7), les lames ont été revues conjointement jusqu'à obtenir un consensus. Tous les adénocarcinomes ont été gradés selon leur architecture prédominante, comme suit : bas grade (AIS, AIM); grade intermédiaire (lépidoïde, papillaire ou acinaire prédominant); et haut grade (solide, micro-papillaire, mucineux ou solide avec contingent de cellules en bague à chignon prédominant) (Yoshizawa *et al.*, 2011). Dans le but de sous-stratifier les

adénocarcinomes infiltrants à prédominance tubulaire, qui étaient le sous-type le plus fréquent dans notre cohorte, nous avons évalué les atypies nucléaires, le compte mitotique et la présence de foyer cribriforme. Ces facteurs étant connus pour représenter des critères d'agressivité de ces tumeurs (Kadota et al., 2013 ; Kadota et al., 2012). Nous avons appliqué les critères de ces auteurs pour caractériser les atypies nucléaires et pour évaluer la présence de foyer cribriforme. Pour le compte mitotique, nous avons légèrement modifié celui de Kadota *et al*, comme suit : bas : 0–4 mitoses/10 HPF, intermédiaire : 5-10 mitoses/10 HPF; et haut : >10 mitoses/10HPF. L'expression du TTF1 (Thyroid Transcriptional Factor 1, clone SP24 de Novocastra) a été analysée pour les 407 adénocarcinomes. Nous avons analysé également le degré de l'infiltration pleurale et la présence ou non d'emboles vasculaires. Le stade des tumeurs a été requalifié selon la 7ème classification TNM 2009 (Sobin and Compton, 2010).

Analyse moléculaire

Pour chaque tumeur, le bloc le plus richement tumoral, c'est-à-dire renfermant au moins 20% de cellules tumorales, a été sélectionné pour l'analyse moléculaire. L'ADN génomique a été extrait à partir du bloc fixé et inclus en paraffine en utilisant le kit commercial (illustra™ DNA extraction kit BACC2, GE Healthcare). Les altérations moléculaires communes des gènes *EGFR* (exon 19 délétions (DEL19), exon 20 insertions (INS20) et p.L858R), *KRAS* (p.G12A, p.G12C, p.G12R, p.G12V, p.G12S, p.G12D et p.G13D), *BRAF* (p.V600E) et *HER2* (exon 20 insertions) ont été analysées grâce à l'analyse de fragment pour les insertions et délétions et en utilisant les sondes Taqman pour les mutations ponctuelles comme déjà décrit par l'équipe (Didelot *et al.*, 2012). Les réarrangements du gène *ALK* ont été étudiés selon l'algorithme utilisé dans le service de pathologie de l'Hôtel Dieu : étude immunohistochimique avec le clone 5A4 (Cliniscience, 1/50 dilution) puis étude par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) et étude par RT-PCR si l'immunohistochimie est positive (seuil de positivité : > 10% de cellules tumorales positives). La FISH utilise les sondes break apart (Vysis LSI ALK Dual Color, Abbott Molecular, Abbott Park, Illinois, USA), elle est considérée positive si > 15% des cellules tumorales possèdent un signal split ou un signal rouge isolé (cf. chapitre 6 de l'introduction générale). Pour la technique de RT-PCR, l'ARN total a été extrait des mêmes blocs tumoraux en paraffine que pour l'extraction d'ADN ou que ceux utilisés pour l'immunohistochimie ou la technique FISH, grâce au kit RNeasy FFPE (Qiagen, France). Un à deux microgrammes d'ARN total ont été rétro-transcrits avec le kit SuperScript® II Reverse Transcriptase (Life Technologies). La PCR quantitative a été

utilisée avec les sondes TaqMan (Life Technologies) et permet de détecter les variants les plus fréquents des transcrits de fusion EML4-ALK : Hs03654558 (E6a/b;A20 ALK variant), Hs03654556 (E13;A20), Hs03654557 (E20;A20), HS03654560 (E17) et Hs03654559 (E18;A20). RPL13A (Hs03043885) sert de contrôle (Just PA, Lung Cancer 2012), un échantillon avec un Ct > 30 pour RPL13A est considéré comme non informatif. Chaque réaction est réalisée en duplicate dans un volume final de 5µl avec le kit Gene Expression Master Mix (Lifetechnologies) utilisant le thermocycleur 7900HT (Applied Biosystems, LifeTechnologies).

Analyse statistique

Les associations statistiques entre les caractéristiques cliniques, les mutations ou les grades histologiques ont utilisé le test chi² ou de Fisher pour les variables catégorielles et les tests de Student's ou Wilcoxon pour les variables continues. Le taux de survie a été calculé en utilisant la méthode de Kaplan–Meier, et les différences ont été analysées grâce au log-rank test. Toutes les variables associées à la survie ayant un p < 0,05 à l'analyse univariée ont été utilisées pour l'analyse multivariée, hormis les stades T et N déjà inclus dans le stade TNM. Une valeur de p < 0,05 est considérée comme significative. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel R (<http://www.r-project.org/>).

Résultats

Caractéristiques des patients et des tumeurs

Les 407 patients consécutifs atteints d'adénocarcinomes pulmonaires primitifs ont été opérés par lobectomies (N= 378) ou pneumonectomies (N=29) dans un but curatif entre 2001 et 2005. Il s'agissait de 288 hommes et 119 femmes. L'âge médian était 61 ans [range : 19-84]. Les fumeurs (> 15 PA) représentaient 81% des patients étudiés, 156 patients étaient porteurs d'une BPCO de stade I à III selon la classification de GOLD (Global Initiative for Obstructive Lung Disease). Les stades pathologiques selon la TNM 2009 représentaient 189, 104, 107 et 7 patients pour les stades I, II, III et IV, respectivement (Tableau 8). Selon les critères de la classification IASLC/ATS/ERS 2011, 1 AIM sans AIS a été retrouvé. L'architecture tubulaire prédominante était la plus fréquente, retrouvée dans 191 tumeurs (47%). Les architectures solide 109 (27%) et papillaire 73 (18%), étaient les deuxième et troisième en fréquence, respectivement. Les sous-types prédominants mucineux, lépidique, micro-papillaire et solide avec cellules en bague à chignon représentaient 16, 11, 4 et 2 tumeurs, respectivement. Une

forte concordance entre les deux pathologistes a été retrouvée, 98.4% (95% CI: 95.5%-99.7%, $p < 0.001$) pour le sous-type tubulaire; 97.3% (95% CI: 90.4%-99.7%, $p < 0.001$) pour le sous-type papillaire; 98.2% (95% CI: 93.5%-99.8%, $p < 0.001$) pour le sous-type solide, et 100% pour le reste qui concernait des sous-types plus rares. Ainsi, seulement un adénocarcinome était de bas grade, alors que 275 étaient de grade intermédiaire et 131 de haut grade. L'expression du TTF1 était retrouvée dans 368 tumeurs (90%), l'invasion pleurale dans 232 tumeurs (57%) et les embols vasculaires dans 230 tumeurs (59%) (Tableau 8).

En considérant tous les stades, les tumeurs de haut grades étaient plus souvent TTF1 négative ($p = 10^{-8}$), présentaient moins de mutations *EGFR* ($p = 0.01$), plus d'embols vasculaires ($p = 0.03$) et correspondaient le plus souvent à des pneumonectomies ($p = 0.01$) comparé au grade intermédiaire (Tableaux 8 et 11). Dans les stades 1 uniquement, le TTF1 ($p = 4.10^{-5}$) et la présence d'embols vasculaires ($p = 0,012$) étaient également associés au grade histologique (Tableau 9).

Puisque le sous-type tubulaire était le plus fréquent, nous avons analysé si la présence d'atypie nucléaire, le compte mitotique et la présence de foyer cribriforme pouvaient sous-diviser ces tumeurs en fonction de leur gravité. Nous avons mis en évidence que les atypies nucléaires et les mitoses étaient significativement associées ($p = 3.10^{-12}$). Tous deux étaient associées à l'envahissement pleural ($p = 0.046$ et $p = 0.024$, respectivement) et à une faible fréquence de mutations *EGFR* ($p = 0.0084$ et $p = 0.024$, respectivement). Les mitoses étaient associées significativement aux embols vasculaires ($p = 0.0015$), et les foyers cribriformes étaient significativement associés aux atypies nucléaires ($p = 1,6.10^{-6}$), aux mitoses ($p = 8,6.10^{-12}$) et aux embols vasculaires ($p = 0.005$) (Tableau 10).

	Total n = 407	Grade intermédiaire n = 275	Haut grade n = 131	P-value
Homme	288 (71%)	190 (69%)	97 (74%)	ns
Age médiane [range]	61 [19-84]	61 [19-84]	62 [37-83]	ns
Tabac PA médiane [range]	39 [0-100]	38 [0-90]	41[0-100]	ns
BPCO (oui -non)	156 (42%) - 214 (58%)	95 (39%) - 151 (61%)	60 (49%) -63 (51%)	ns
Lobectomie - Pneumonectomie	378 (93%) - 29 (7%)	262 (95%) - 13 (5%)	115 (88%) - 16 (12%)	0.01
Sous-type histologique (prédominant)				
Lépidique	-	11	-	
Tubulaire	-	191	-	
Papillaire	-	73	-	na
Solide	-	-	109	
Mucineux	-	-	16	
Micropapillaire	-	-	4	
Bague à chaton	-	-	2	
TTF1 (oui -non)	368 (90%) - 39 (10%)	265 (96%) - 10 (4%)	102 (78%) -29 (22%)	10⁻⁸
Invasion pleurale (oui -non)	232 (57%) - 175 (43%)	159 (58%) - 116 (42%)	72 (55%) - 59 (45%)	ns
Embols vasculaires (oui -non)	229 (59%) - 160 (41%)	146 (55%) - 117 (45%)	83 (66%) - 42 (34%)	0.03
Stade (tumeur)				
pT1	101	77	24	
pT2	191	130	60	
pT3	84	51	33	0.05
pT4	31	17	14	
Stade (ganglion)				
pN0	268	188	79	
pN1	67	38	29	ns
pN2	72	49	23	
Stade TNM				
I	189	137	51	
II	104	65	39	ns
III	107	67	40	
IV	7	6	1	

TABLEAU 8: CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET PATHOLOGIQUES DES PATIENTS ATTEINTS D'UN ADENOCARCINOME PULMONAIRE EN FONCTION DU GRADE HISTOLOGIQUE.

Le bas grade a été exclu puisqu'il n'était constitué que d'une seule tumeur (adénocarcinome avec invasion minime), nous avons donc comparé uniquement le groupe de grade intermédiaire à celui de haut grade. BPCO: bronchopneumopathie chronique obstructive. na: non applicable; ns: non significatif. PA : paquets-années.

	Total n = 189	Grade Intermédiaire n = 137	Haut grade n = 51	P-value
Homme	140 (74%)	100 (73%)	40 (78%)	ns
Age médiane [range]	61 [31-82]	61 [31-81]	61 [38-82]	ns
Tabac (Paquet-année médiane [range])	41 [0-100]	41[0-90]	42 [0-100]	ns
BPCO (oui - non)	74(43%)-98(57%)	50(40%)-74(60%)	24(50%)-24(50%)	ns
Lobectomie - Pneumonectomie	188-1	137-0	50-1	ns
Sous-type histologique (prédominant)				
Lépidique	-	6	-	
Acinaire	-	88	-	
Papillaire	-	43	-	na
Solide	-	-	42	
Mucineux	-	-	6	
Micropapillaire	-	-	2	
Cellules en bague à chaton	-	-	1	
TTF1 (oui -non)	173(92%)-16(8%)	133(97%)-4(3%)	39(76%)-12(24%)	4.10⁻⁵
Invasion Pleurale (oui - non)	81(43%)-108(57%)	58(42%)-79(58%)	23(45%)-28(55%)	ns
Embols Vasculaires (oui – non)	73(40%)-111(60%)	45(34%)-87(66%)	28(55%)-23(45%)	0.012
Statut moléculaire				
<i>EGFR</i> ^{WT} <i>KRAS</i> ^{WT}	102	72	30	
<i>KRAS</i> ^{Mut}	63	46	17	ns
<i>EGFR</i> ^{Mut}	19	16	3	
indéterminé	5			

TABLEAU 9 : CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET PATHOLOGIQUES DES PATIENTS ATTEINTS D'UN ADENOCARCINOME PULMONAIRE DE STADE I EN FONCTION DU GRADE HISTOLOGIQUE
Le bas grade a été exclu puisqu'il n'était constitué que d'une seule tumeur (adénocarcinome avec invasion minimale), nous avons donc comparé uniquement le groupe de grade intermédiaire à celui de haut grade. BPCO: bronchopneumopathie chronique obstructive. na: non applicable; ns: non significatif.

Variables	Atypies nucléaires			p-Value	Compte mitotique			p-Value	Secteur cribriforme			p-Value
	Faible n= 41	Modérée n= 106	Sévère n= 38		Bas n= 71	Intermédiaire n= 40	Elevé n= 74		sans n= 106	quelques n= 65	prédominant n= 14	
Age médiane [range]	66 [19-82]	61 [40-80]	60 [31-82]	0,032	64 [19-82]	57 [41-80]	61 [31-82]	0.11	64 [19-82]	60 [31-81]	58 [40-80]	0,2
Homme-Femme	23-18	81-25	23-15	0,029	45-26	30-10	52-22	0.45	68-38	48-17	11-3	0,33
Tabac (PA) median [range])	37 [0-90]	37 [0-90]	42 [0-80]	0,53	34 [0-90]	40 [0-80]	41 [0-90]	0.2	36 [0-90]	42 [0-90]	34 [0-60]	0,26
BPCO (oui - non)	11-24	35-57	15-23	0,093	22-42	19-19	20-43	0.18	37-60	19-37	5-7	0,73
Lobectomie-Pneumectomie	39-2	103-3	33-5	0,05	69-2	40-0	66-8	0,029	103-3	58-7	14-0	0,068
TTF1 (oui -non)	41-0	101-5	36-2	0,44	71-0	38-2	69-5	0,0068	103-3	61-4	14-0	0,56
Invasion pleurale (oui -non)	19-22	63-43	28-10	0,046	34-37	24-16	52-22	0,024	56-50	43-22	11-3	0,076
Embols vasculaires (oui -non)	18-21	69-33	22-14	0,065	32-35	21-16	56-17	0,0015	51-48	46-18	12-2	0,005
Stade TNM												
I	27	43	15	0,069	40	18	27	0.18	51	28	6	0,47
II	8	30	12		14	11	25		31	17	2	
III-IV	6	33	11		17	11	22		24	20	6	
Atypies nucléaire												
Faible				na	35	3	3	3x10⁻¹²	34	3	4	1.6x10⁻⁶
Modérée					33	24	49		58	38	10	
Sévère					3	13	22		14	24	0	
Compte mitotique												
Bas	35	33	3	3x10⁻¹²				na	62	7	2	8.6x10⁻¹²
Intermédiaire	3	24	13						23	14	3	
Haut	3	49	22						21	44	9	
Cribriforme pattern												
Sans	34	58	14	1.6x10⁻⁶	62	23	21	8x10⁻¹²				na
Quelques	3	38	24		7	14	44					
Prédominant	4	10	0		2	3	9					
<i>KRAS</i> mutation (oui -non)	30-11	69-37	26-12	0,67	22-49	12-28	26-48	0.84	28-78	26-39	6-8	0,12
<i>EGFR</i> mutation (oui -non)	10-31	10-96	1-37	0,0084	14-57	2-38	5-69	0,024	16-90	5-60	0-14	0,17
Survie Globale à 5 ans (%)	57,3	62,3	48,5	0,18	64,4	61,2	51,5	0,3	63,4	51,3	54,5	0,31

TABEAU 10 : SOUS-STRATIFICATION DES ADENOCARCINOMES TUBULAIRES EN FONCTION DES ATYPIES NUCLEAIRES, DU COMPTE MITOTIQUE ET DES SECTEURS CRIBRIFORMES

Analyse moléculaire et corrélation avec les caractéristiques cliniques et histologiques

Dix échantillons sur 407 n'ont pas été amplifiables. Les mutations *KRAS* et *EGFR* représentaient respectivement 34% (136/397) et 9.6% (38/397) des tumeurs. La plus fréquente des mutations *KRAS* était la p.G12C (59/136) (43%). Parmi les 38 tumeurs *EGFR* mutées, on comptait 17 délétions de l'exon 19, 18 p.L858R et 3 insertions de l'exon 20. Concernant les altérations moléculaires rares, 4 échantillons avaient une insertion sur l'exon 20 de *HER2* et un seul était muté *BRAF* (p.V600E). Toutes ces mutations étaient mutuellement exclusives, exceptée une tumeur qui présentait une double mutation *KRAS* et *HER2*. Les mutations *EGFR* étaient plus fréquentes dans les tumeurs de grade intermédiaire (p=0.01) (Tableau 11). Les mutations *KRAS* n'étaient pas liées au grade histologique bien que les adénocarcinomes mucineux soient souvent mutées *KRAS* (12/16, p=0.003) et jamais mutées *EGFR* (Tableau 11). Dans les adénocarcinomes d'architecture tubulaire prédominante, les mutations *KRAS* n'étaient pas associées à des critères pathologiques particuliers ; en revanche, les tumeurs tubulaires mutées *EGFR* avaient moins d'atypie nucléaire (p=0.0084) et moins de mitoses (p=0.024) (Tableau 10). Concernant l'étude du réarrangement du gène *ALK*, une grande partie des techniques FISH réalisées n'a pas été interprétable et nous avons retrouvé uniquement deux tumeurs réarrangées. La RT-PCR n'a pas permis de retrouver de tumeur réarrangées, les deux tumeurs FISH + n'étaient pas amplifiables. Nous avons donc exclu l'analyse des réarrangements du gène *ALK* de cette étude.

	<i>EGFR</i> ^{WT} <i>KRAS</i> ^{WT} n=223	<i>KRAS</i> ^{Mut} n = 136	P- value	<i>EGFR</i> ^{Mut} n = 38	P-value
Homme	163 (73%)	108 (79%)	ns	10 (26%)	ns
Age médiane [range]	60 [19-83]	61[38-83]	ns	68 [46-83]	10⁻⁵
Tabac (oui –non) (Paquet-année médiane [range])	184 (84%)-34 (16%) 42[0-100]	124 (93%)-10 (7%) 42 [0-100]	0.003 ns	8 (22%)-28 (78%) 6.9[0-35]	2.10⁻¹³ 10⁻¹⁴
BPCO (oui –non)	86 (42%) - 119 (58%)	58 (48%) - 63 (52%)	ns	9 (26%) - 26 (74%)	ns
Lobectomie - Pneumonectomie	204 (91%) – 19 (9%)	127 (93%) - 9 (7%)	ns	37 (97%) - 1 (3%)	ns
Sous-type histologique (prédominant)					
Lépidique	6 (2.7%)	3 (2%)	ns	2 (5%)	ns
Tubulaire	104 (47%)	60 (44%)	ns	21 (56%)	ns
Papillaire	38 (17%)	24 (18%)	ns	10 (26%)	ns
Solide	67 (30%)	36 (26%)	ns	3 (8%)	0.003
Mucineux	4 (1.8%)	12 (9%)	0.003	0	ns
Micropapillaire	1 (0.5%)	1 (1%)	ns	2 (5%)	ns
Cellules en bague à châton	2 (1%)	0	ns	0	ns
Grade histologique					
Intermédiaire	148 (67%)	87 (64%)	ns	33 (87%)	0.01
Haut	74 (33%)	49 (36%)		5 (13%)	
TTF1 (oui -non)	201 (90%) - 22 (10%)	121 (89%) - 15 (11%)	ns	37 (97%) - 1 (3%)	ns
Invasion pleurale (oui -non)	122 (55%) - 101 (45%)	82 (60%) - 54 (40%)	ns	23 (60%) - 15 (40%)	ns
Embols vasculaires (oui -non)	126 (61%) - 82 (39%)	79 (59%) - 54 (41%)	ns	18 (47%) - 20 (53%)	ns
Stade (tumeur)					
pT1	58 (26%)	32 (24%)		8 (21%)	
pT2	95 (43%)	71 (52%)	ns	22 (58%)	ns
pT3	50 (22%)	23 (17%)		7 (18%)	
pT4	20 (9%)	10 (7%)		1 (3%)	
Stade (ganglion)					
pN0	153 (68%)	85 (63%)	ns	23 (60%)	ns
pN1	35 (16%)	28 (20%)		3 (8%)	
pN2	35 (16%)	23 (17%)		12 (32%)	
Stade TNM					
I	103 (46%)	63 (46%)		19 (50%)	
II	59 (27%)	35 (26%)	ns	7 (18%)	ns
III	57 (25%)	35 (26%)		12 (32%)	
IV	4 (2%)	3 (2%)		0	

TABLEAU 11 : CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET PATHOLOGIQUES DES TUMEURS *KRAS* ET *EGFR* MUTEES

BPCO: bronchopneumopathie chronique obstructive. ns: non significatif. na : non applicable.

Analyse de la survie

La survie globale à 5 ans et à 10 ans était de 53.2% (CI: 48.4-58.6) et 32.6 % (CI: 25-42.6), respectivement. A l'analyse univariée, l'âge ($p=0.0006$), le type de résection ($p=0.003$), le pT ($p=1,5.10^{-8}$), le pN ($p=1.10^{-8}$); le stade TNM 2009 ($p=3,6.10^{-11}$), l'invasion pleurale ($p=0.008$), et les embols vasculaires ($p=0.0003$) étaient associés à la survie. Ni les mutations *EGFR* ni les mutations *KRAS* n'étaient significativement associées à la survie ($p=0.6$ et $p=0.3$, respectivement) (Tableau 12).

Les patients atteints d'une tumeur avec un grade histologique intermédiaire avaient significativement une meilleure survie comparée aux tumeurs de haut grade ($p=0.001$), avec un taux de survie à 5 ans de 58.6% et 46.1% respectivement, et un taux de survie à 10 ans de 42.4% et 21.4% respectivement (Figure 23). Le grade histologique restait un facteur pronostique significatif pour les tumeurs de stade I uniquement (Tableau 14, Figure 24). Selon la classification IASLC/ATS/ERS, les tumeurs possédant une architecture lépidique, tubulaire et papillaire prédominante étaient associées à un taux de survie à 5 ans de 55.6%, 58.2%, 58.8% respectivement, comparé aux type solide, mucineux, micro-papillaire et solide avec cellules en bague à chaton qui avaient un taux de survie à 5 ans de 45.1%, 26.7% 50%, 0%. Les analyses combinées du grade histologique et du stade TNM 2009 amélioraient la prédiction de la survie à 5 ans car les patients ayant des tumeurs de grade intermédiaire/stade I avaient une meilleure survie que les tumeurs de haut grade/stage III-IV, avec un taux de survie à 5 ans de 71.9% et 28.2%, respectivement. Nous n'avons pas retrouvé d'association entre la survie globale et le compte mitotique, les atypies nucléaires ou les foyers cribriformes. En revanche, il est intéressant de noter que la survie à 5 ans des patients avec une tumeur tubulaire avec >10% de foyers cribriformes (51,3%) était moins bonne que celle des autres tumeurs tubulaires (58.2%) mais meilleure que celle des tumeurs à prédominance solide (45.1%). Comme attendu, le grade histologique combiné au stade TNM 2009 améliorait la prédiction de la survie, ainsi les patients ayant une tumeur de stade I de grade intermédiaire avaient la meilleure survie à 5 ans (71.9%) alors que ceux ayant une tumeur de haut grade/stage III-IV avaient la moins bonne survie à 5 ans (28.2%).

A l'analyse multivariée (modèle incluant le grade, le stade, l'âge, le type de résection, l'invasion pleurale et les embols vasculaires), les facteurs pronostiques indépendants étaient l'âge, le stade et le grade histologique (Tableau 13).

Paramètres		Survie à 5 ans (%)	Survie à 10 ans (%)	Hazard Ratio	P-value
Age				1.02	0.0006
Sexe	Homme	51.7	30.9	1.2	0.2
	Femme	61.3	37.1	REF	
Paquets-années				0.99	0.7
BPCO	Oui	50.6	35.2	1.2	0.3
	Non	57.5	32.6	REF	
Type de résection	Pneumonectomie	37.5	16.7	2	0.003
	Lobectomie	55.8	33.3	REF	
Grade Histologique	Intermédiaire	58.6	42.4	REF	0.001
	Haut	46.1	21.4	1.5	
Stade (tumeur)	T1	69.8	48.5	REF	7x10⁻³
	T2	56.9	37.1	1.7	
	T3-T4	33.2	16.1	3.2	
Stade (ganglion)	N0	62	39.5	REF	1.5x10⁻⁸
	N1	41.6	24.8	1.7	
	N2	29.7	0	2.6	
Stade TNM	I	65.1	44.2	REF	4x10⁻³
	II	54.8	31.6	1.5	
	III-IV	36.8	15	2.9	
Embols vasculaires	Oui	49.1	29.7	1.7	1x10⁻⁸
	Non	62.9	36.2	REF	
Invasion pleurale	Oui	50.4	29.9	1.5	0.003
	Non	60	36.8	REF	
TTF-1	Oui	56.2	32.2	0.67	0.07
	Non	38.5	35.1	REF	
Mutation <i>KRAS</i>	Oui	49.6	0	1.2	0.3
	Non	57.1	36.8	REF	
Mutation <i>EGFR</i>	Oui	65.8	0	0.89	0.6
	Non	53.9	35.1	REF	

TABLEAU 12 : ANALYSE UNIVARIEE DE LA SURVIE GLOBALE

BPCO: bronchopneumopathie chronique obstructive. L'âge et le nombre de paquets-années ont été étudiés comme variables continues. REF: paramètre de référence utilisé dans l'analyse de Cox.

Paramètre	Hazard Ratio	P-value
Age (années)	1.03	1.10⁻⁴
Type de résection		
Pneumectomie	1.3	0.3
Lobectomie	REF	
Stade TNM		
I	REF	
II	1.3	0.2
III-IV	2.4	3.10⁻⁶
Grade Histologique		
Intermédiaire	REF	0.03
Haut	1.36	
Embols Vasculaires		
Oui	1.3	0.1
Non	REF	
Invasion pleurale		
Oui	1.3	0.1
Non	REF	

TABLEAU 13 : ANALYSE MULTIVARIEE DE LA SURVIE GLOBALE

BPCO: bronchopneumopathie chronique obstructive. L'âge et le nombre de paquets-années ont été étudiés comme variables continues. REF: paramètre de référence utilisé dans l'analyse de Cox.

Paramètre		Analyse Univariée		Analyse Multivariée
		Hazard Ratio	P-value	P-value
Age		1.02	0.046	0.037
Sexe	Homme	1.4	0.22	ni
	Femme	REF		
Paquets-années		1	0.63	ni
BPCO	Oui	1.1	0.65	ni
	Non	REF		
Type de résection	Pneumectomie	7.7	0.046	ns
	Lobectomie	REF		
Grade histologique	Intermédiaire	REF	0.032	0.021
	Haut	1.7		
Embols vasculaires	Oui	1.4	0.15	ni
	Non	REF		
Invasion pleurale	Oui	1.6	0.048	ns
	Non	REF		
TTF-1 expression	Oui	0.74	0.45	ni
	Non	REF		
KRAS mutation	Oui	1.5	0.11	ni
	Non	REF		
EGFR mutation	Oui	0.9	0.78	ni
	Non	REF		

TABLEAU 14 : ANALYSES UNIVARIEE ET MULTIVARIEE DE LA SURVIE GLOBALE CHEZ LES PATIENTS DE STADE I

BPCO: bronchopneumopathie chronique obstructive. L'âge et le nombre de paquets-années ont été étudiés comme variables continues. REF: paramètre de référence utilisé dans l'analyse de Cox. ni : non inclus

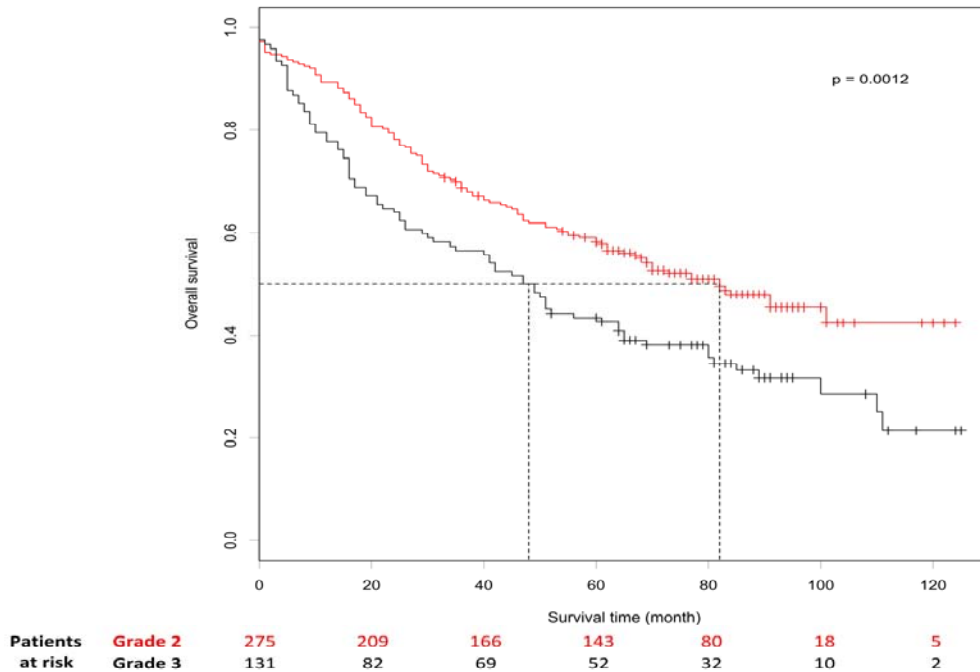


FIGURE 23 : COURBE DE KAPLAN-MEIER DE LA SURVIE GLOBALE DES ADENOCARCINOMES PULMONAIRES DE TOUS STADES, SELON LE GRADE HISTOLOGIQUE (LOG-RANK TEST)

Les tumeurs ont été divisées en 2 grades histologiques selon la classification IASLC/ATS/ERS : grade intermédiaire (architecture lépidique, tubulaire et papillaire) prédominante) et haut grade (architecture solide, mucineux, micropapillaire et solide avec cellules en bague à châton prédominante).

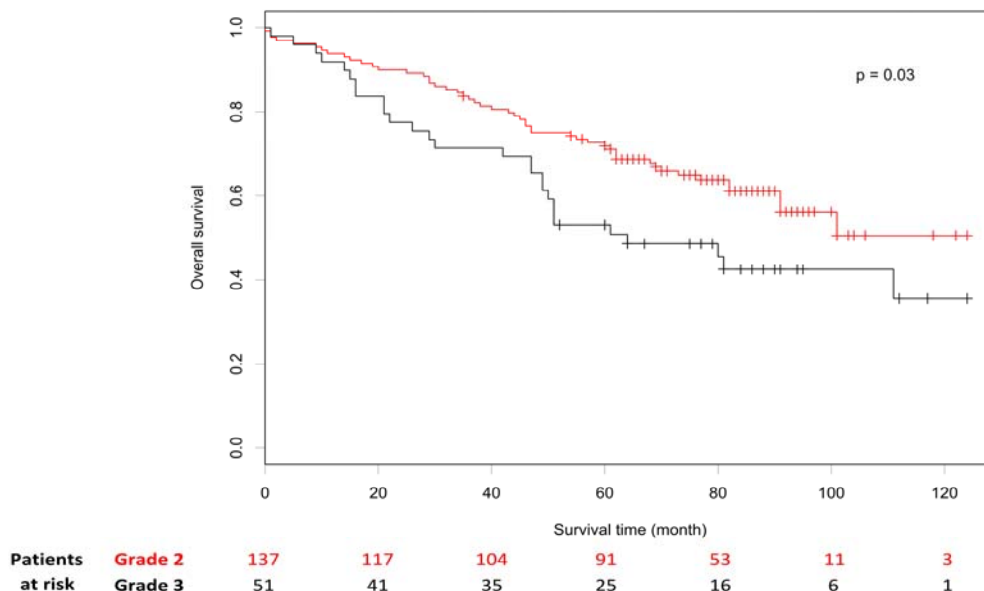


FIGURE 24 : COURBE DE KAPLAN-MEIER DE LA SURVIE GLOBALE DES ADENOCARCINOMES PULMONAIRES DE STADE I, SELON LE GRADE HISTOLOGIQUE (LOG-RANK TEST)

Discussion

L'objectif de cette étude a été de valider la valeur pronostique de la classification IASLC/ATS/ETS dans une série caucasienne consécutive et rétrospective d'adénocarcinomes pulmonaires. Les patients ont été opérés dans un seul centre chirurgical de 2001 à 2005, les tumeurs ont été reclassées selon la classification des adénocarcinomes pulmonaires IASLC/ATS/ERS de 2011 et selon le stade TNM 2009. Nous avons ainsi démontré que (1) le sous-type architectural prédominant des adénocarcinomes est un facteur indépendant prédictif de la survie dans une population non-asiatique ; (2) les mutations *EGFR* et *KRAS* sont significativement associées au sous-type histologique mais n'ont pas de valeur pronostique ; (3) certains paramètres cliniques et histologiques ont une valeur pronostique en analyse univariée (âge, type de résection, pT, pN, stade pTNM, grade histologique, invasion pleurale et embols vasculaires tumoraux) et en analyse multivariée (âge, stade TNM et grade histologique).

La distribution des sous-types histologiques prédominants dans la littérature est très hétérogène, elle est probablement liée aux différences épidémiologiques des populations analysées (Russell et al., 2013 ; Gu et al., 2013; Zhang et al., 2013; Yoshizawa et al., 2013; Yoshizawa et al., 2011; Tsuta et al., 2013; Song et al., 2013; Russell et al., 2011). Dans notre étude les sous-types tubulaire, solide et papillaire prédominants représentaient plus de 90% de tous les adénocarcinomes (48%, 26%, et 18%, respectivement), alors que les sous-types micropapillaire et solide à bague à châton prédominant étaient rares (4% et 2%, respectivement). Nos résultats étaient en accord avec ceux de Russell *et al.*, qui retrouvait dans une série de 210 adénocarcinomes, l'architecture tubulaire, solide et papillaire prédominante dans respectivement 40%, 23% et 12% (Russell *et al.*, 2011). De même, comme cela a déjà été rapporté (Warth *et al.*, 2012), les AIM étaient rares (n= 1) et nous n'avons pas retrouvé d' AIS. Dans notre étude, nous avons exclu les résections infralobaires, ce qui peut expliquer le faible nombre d'AIM et d' AIS qui sont généralement traités par ce type de chirurgie conservatrice. De plus, le pouvoir de détection du scanner n'était probablement pas, pendant la période étudiée (2001-2005), aussi élevé qu'actuellement pour le diagnostic de ces lésions (Church *et al.*, 2013). Enfin, les différences ethniques, particulièrement entre les asiatiques et les caucasiens, peuvent expliquer les différences histologiques comme c'est aussi le cas avec la distribution des mutations *EGFR* dans ces populations. Certaines études ont démontré une plus grande fréquence des mutations *EGFR* dans les adénocarcinomes à prédominance lépidique (Li *et al.*, 2013 ; Shim *et al.*, 2011 ; Song *et al.*, 2013 ; Sun *et al.*, 2012 ; Warth *et*

al., 2013), cependant dans notre étude si les mutations *EGFR* étaient plus fréquentes dans le groupe intermédiaire ($p= 0.01$), elles n'atteignaient pas la significativité pour le sous-type lépidique probablement à cause du faible nombre de lépidique (2.7%). Nous avons par ailleurs retrouvé une association presque significative entre le sous-type micropapillaire et les mutations *EGFR* ($p=0.057$), comme dans d'autres équipes (Song *et al.*, 2013 ; Warth *et al.*, 2013 ; Motoi *et al.*, 2008 ; Ninomiya *et al.*, 2009).

La valeur pronostique des grades histologiques basée sur la classification IASLC/ATS/ERS reste valide indépendamment de l'origine ethnique des patients. Comme cela a déjà été rapporté, les patients atteints d'un adénocarcinome mucineux ont un mauvais pronostic (36.7% de survie à 5 ans), et cette entité est significativement associée aux mutations du gène *KRAS* (Tsuta *et al.*, 2013; Yoshizawa *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2012). La valeur pronostique des grades histologiques est liée à l'agressivité de la tumeur. En effet, les adénocarcinomes de haut grade ont plus souvent des embols vasculaires ($p=0.03$) et sont plus souvent retrouvés sur pièce de pneumonectomie ($p=0.01$). De manière intéressante, dans les sous-types tubulaires prédominants, la présence de mitose et de foyers cribriformes permettent d'identifier des patients ayant un plus mauvais pronostic, comme cela a déjà été démontré (Kadota *et al.*, 2013; Kadota *et al.*, 2012).

Conclusion

Nous avons confirmé la valeur pronostique des grades histologiques, basée sur la classification IASLC/ATS/ERS des adénocarcinomes pulmonaires. Nous avons démontré que les caractéristiques cliniques et moléculaires étaient liées aux grades histologiques suggérant que les voies oncogéniques sont probablement associées aux morphologies particulières de ces tumeurs.

PARTIE II : Etude de la distribution des mutations et du nombre de copies du gène *EGFR* dans une série caucasienne d'adénocarcinomes pulmonaires, et de son impact sur le diagnostic moléculaire initial

Introduction

Les adénocarcinomes pulmonaires sont le type histologique le plus fréquent dans les carcinomes pulmonaires. Ils représentent plus de 50 % des carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules. Leurs aspects morphologiques et moléculaires sont très hétérogènes selon les patients. En effet, différents types architecturaux sont possibles et une même tumeur est le plus souvent composée de plusieurs types architecturaux différents (Yoshizawa et al., 2011). Différentes voies oncogéniques ont été mises en évidence, certaines étant associées à une sensibilité à des thérapies ciblées (Coate et al., 2009). Les mutations *EGFR* ont été découvertes en 2004, elles sont identifiées principalement dans les adénocarcinomes pulmonaires (Lynch et al., 2004; Sordella et al., 2004). Leur prévalence varie avec l'ethnie de la population étudiée, on compte environ 10 à 15 % de mutation *EGFR* dans la population caucasienne et jusqu'à plus de 40% dans la population asiatique (Subramanian and Govindan, 2007). Leur découverte a rapidement été suivie de la prescription d'une thérapie ciblée efficace. En effet depuis 2010, la présence d'une mutation *EGFR* conduit à la prescription d'une thérapie ciblée par ITK anti-EGFR en première ligne de traitement chez les patients porteurs d'un CBPNPC de stade avancé (Fukuoka et al., 2011). Le statut mutationnel *EGFR* doit donc être recherché de manière systématique chez tous les patients porteurs d'un CBPNPC de stade avancé (stade III-IV). Dans ce contexte, l'hétérogénéité génétique intratumorale a été décrite dans plusieurs études et pourrait contribuer à expliquer certaines résistances à des thérapies ciblées (Inukai *et al.*, 2006) (Gerlinger and Swanton, 2010; Gerlinger *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2010; Turner and Reis-Filho, 2012). En effet, certains prétendent que les résistances secondaires aux thérapies ciblées ne sont en fait pas réellement acquises pendant la thérapie mais qu'elles seraient déjà présentes avant l'initiation du traitement dans des sous-clones qui proliféreront sous l'effet de la pression de sélection imposée par le traitement.

Cependant, si cette hétérogénéité existe, la conduite actuelle de recherche moléculaire sur un fragment biopsique serait à remettre en question et pourrait avoir des conséquences majeures

sur la thérapie ciblée. Les études sont nombreuses et surtout contradictoires sur ce sujet. Certains prétendent que les mutations *EGFR* sont hétérogènes au sein de la même tumeur et entre la tumeur primitive et ses métastases (Jiang *et al.*, 2008 ; Sakurada *et al.*, 2008; Taniguchi *et al.*, 2008. Au contraire, d'autres suggèrent que cette hétérogénéité des mutations *EGFR* est extrêmement rare et serait plutôt liée à des différences de sensibilité des techniques les mettant en évidence et que le nombre de copies du gène *EGFR* pourrait avoir un rôle en améliorant la détection de la mutation lorsqu'il existe de nombreuses copies du gène (Yatabe *et al.*, 2011 ; Jakobsen and Sørensen, 2012). Les études concernant ce sujet proviennent essentiellement de la population asiatique où la prévalence des mutations *EGFR* est importante, les études sont plus rares dans la population caucasienne.

L'hétérogénéité des mutations *EGFR* pourrait également expliquer l'apparition de résistance secondaire aux ITK anti-EGFR. Les mécanismes de résistance secondaire sont nombreux, le plus fréquent est l'émergence d'un sous-clone porteur de la mutation pT790M du gène *EGFR*, sélectionné par le traitement anti-EGFR. Cette altération est présente en *cis* d'une autre mutation *EGFR*, elle est rarement détectée avant la mise en place du traitement, soit parce qu'elle n'est pas présente, soit parce que les méthodes de détection ne sont pas assez sensibles. La fréquence de la mutation pT790M avant traitement est très variable selon les études, allant de 1% à 35% (Wu *et al.*, 2011; Rosell *et al.*, 2011) ; ces différences dépendent essentiellement du type de technique utilisée et de leur sensibilité.

Dans cette étude basée sur une population caucasienne, nous avons voulu répondre à plusieurs questions : (1) existe-t-il une hétérogénéité des mutations *EGFR*, y compris de la p.T790M, dans une même tumeur et entre la tumeur primitive et ses métastases ? ; (2) les prélèvements de petite taille sont-ils suffisants pour effectuer une recherche de mutation *EGFR* ? ; (3) le nombre de copies du gène *EGFR* est-il hétérogène pour une même tumeur ?

Patients et méthodes

Les patients

Grâce à la politique française de recherche de mutation *EGFR* chez tous les patients porteurs d'un adénocarcinome pulmonaire de stade avancé, financé en partie par l'INCa, nous avons analysé 357 patients consécutifs dont le diagnostic d'adénocarcinome pulmonaire a été porté à l'Hôtel Dieu entre janvier 2010 et juin 2011. Sur les 357 patients analysés, 57 possédaient une tumeur mutée *EGFR* (15.9% de la série), sans autre mutation concomitante *KRAS* ou *HER2*. Seuls 40 patients avaient assez de tissu disponible pour effectuer les analyses dans différentes

parties de la tumeur. Les caractéristiques des patients figurent dans le tableau 15 et sont en accord avec celles de la littérature concernant les patients caucasiens (Calvo and Baselga, 2006) (Pao and Girard, 2011). Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique local (CPP 2012 06-12).

Sexe	
Homme	13
Femme	27
Age (années)	Moyenne 64 [42 – 81]
Tabagisme	
≤ 10 PA	15
> 10 PA	14
inconnu	11
Stade TNM au diagnostic	
I	4
II	4
III	9
IV	20
inconnu	3

TABLEAU 15 : CARACTERISTIQUES CLINIQUES DES 40 PATIENTS POSSEDANT UN ADENOCARCINOME *EGFR* MUTE

La recherche moléculaire a été effectuée car les patients indiqués de stade I ou II ont rechuté.

Les échantillons tissulaires

La totalité des lames, provenant de blocs fixés et inclus en paraffine, des tumeurs de 40 patients ont été relues permettant de confirmer le diagnostic. Toutes les tumeurs correspondaient à des adénocarcinomes exprimant TTF1 (Novocastra, clone SPT24). Sur les 40 adénocarcinomes, 22 ont été réséqués chirurgicalement en totalité permettant de les classer selon la classification IASLC/ATS/ERS. Un total de 153 échantillons, correspondant de 2 à 19 échantillons tumoraux par patient (n=40) ont été sélectionnés par deux pathologistes (moi-même et Pr D Damotte) puis macrodisséqués. Aucune procédure de microdissection n'a été réalisée car nous voulions être dans les conditions habituelles de notre laboratoire. La macrodissection consiste à extraire directement sur le bloc la partie sélectionnée puis la réinclure en paraffine et enfin réaliser des copeaux de 20 à 30 microns qui serviront ensuite à l'extraction d'ADN. Le pourcentage de cellule tumorale a été estimé par les deux pathologistes sur chacun des 153 échantillons, pour 26 échantillons le pourcentage de cellule tumorale était inférieur à 20 %. Ces 153 échantillons étaient constitués de 5 biopsies bronchiques, 2 aspirations bronchiques, 5 biopsies pulmonaires transpariétales sous scanner, 8 liquides pleuraux (culot), 33 biopsies pleurales chirurgicales, 83 pièces de résection

pulmonaires chirurgicales (lobectomies, et wedge résections) et 17 ganglions lymphatiques métastatiques (Tableau 16).

Nous avons également inclus 39 fragments tumoraux provenant de 10 patients atteints d'un adénocarcinome pulmonaire non mutés *EGFR*, *KRAS* ou *HER2*. Ces 39 fragments incluait 3 métastases surrenaliennes, 6 ganglions lymphatiques métastatiques, 2 localisations pleurales et 28 fragments à partir de tumeur primitive (Tableau 17).



FIGURE 25 : PHOTO D'UNE LAME HES UTILISEE POUR LA MACRODISSECTION

Les 7 fragments tumoraux délimités au feutre sur la coupe HES sont ensuite macrodisséqués sur le bloc correspondant.

Analyse du statut mutationnel du gène *EGFR*

L'ADN génomique a été extrait grâce au kit (illustra™ DNA extraction kit BACC2, GE Healthcare), selon leurs recommandations. La stratégie utilisée est de tester la mutation ponctuelle p.L858R, les insertions de l'exon 20 (INS20) et les délétions de l'exon 19 (DEL19) d'*EGFR*, dans le même temps que les mutations *KRAS* et que les insertions de l'exon 20 de *HER2*. Puis, si aucune mutation n'a été retrouvée, l'analyse porte ensuite sur les altérations situées sur les codons 719 and 861 d'*EGFR*. Enfin, la mutation p.T790M est recherchée si une mutation *EGFR* a préalablement été mise en évidence. Les délétions et insertions sont étudiées avec la technique d'analyse de fragment sur l'appareil ABI 3730 XL (Applied biosystems, Foster City, CA) et analysées grâce au logiciel Genemapper software (Applied biosystems). Le seuil de détection de l'analyse de fragment est de 5 à 10 %. Les mutations ponctuelles p.L861Q, p.G719A, p.G719C, p.G719S et p.T790M sont analysées grâce à la technique PCR compétitive allèle spécifique (CAST) avec sondes TaqMan®, sur plaque 384 puits en utilisant l'appareil ABI Prism 7900 (Applied Biosystems) dans un volume final de 5µl (2.5% µl de TaqMan® genotyping master mix 2X (Applied Biosystems), 0.5µl de sondes 10X (Hs00000173_rf, Hs00000141_mu, Hs00000104_mu, Hs00000148_mu, Hs00000146_mu, Hs00000106_mu, Applied Biosystems) et 1µl de solution d'ADN (≤ 20ng/µl)), selon les conditions thermiques suivantes (95°C/10m (92°C/15s, 58°C/1m) pendant

5 cycles, puis (92°C/15s, 60°C/60s) pendant 40 cycles). La validation des échantillons négatifs attendus DEL19 mutés a été testée secondairement en utilisant la technique CAST permettant d'étudier 19 délétions différentes de l'exon 19. L'analyse des résultats est effectuée grâce au logiciel SDS 2.0 (Applied Biosystems). La mutation p.L858R est analysée en utilisant une sonde TaqMan® en même temps qu'une sonde PNA. Les 39 fragments tumoraux non mutés ont été testés pour l'ensemble du panel des mutations du gène *EGFR* (DEL19, INS20, p.L858R, p.L861Q et p.G719X). Tous les échantillons sont réalisés en duplicate.

Analyse du nombre de copies (CN) du gène *EGFR*

Le nombre de copies du gène *EGFR* est analysé par la technique PCR quantitative en temps réel en utilisant trois sondes TaqMan®, l'une située dans l'intron 1, une autre à la jonction intron 7/exon 8 et une dernière à la jonction exon29/intron29 (Hs04960197_cn; Hs01646307_cn; Hs00458616_cn). La ribonucléase p (RNase p) est utilisée comme contrôle interne de référence. Les échantillons sont analysés en triplicate, la différence maximale tolérée est 0,3 entre les triplicates. La moyenne des Ct est utilisée pour l'estimation du nombre de copies en utilisant la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$ comme précédemment décrite (Livak and Schmittgen, 2001). Une augmentation du nombre de copies est définie par une variation de nombre de copie (CN > 2.5). La méthode a été validée par l'utilisation de lignées cellulaires pour lesquels les nombres de copies étaient connus. Les échantillons possédant un Ct >30 ont été exclus de l'analyse du nombre de copie.

Résultats

1- Homogénéité du statut mutationnel *EGFR* dans les différents prélèvements tumoraux

Dans notre série, sur les 40 patients porteurs d'une tumeur *EGFR* mutée, 19 avaient une délétion de l'exon 19 (DEL19), 12 avaient une mutation ponctuelle p.L858R, 6 avaient une insertion de l'exon 20 (INS20), 2 avaient une mutation rare p.G719A et 1 tumeur portait la double mutation p.L861Q/p.T790M au diagnostic.

Sur les 153 échantillons provenant des 40 patients, 4 échantillons n'étaient pas amplifiables (2 correspondaient à une DEL19 et 2 à une INS20). Les mutations *EGFR* ont été identifiées dans 144 des 149 échantillons informatifs amplifiables (Tableau 16). Les 5 autres échantillons ont été retrouvés *EGFR* sauvages (3 échantillons correspondaient à une DEL19 et 2 à une INS20).

Parmi ces 5 échantillons, le pourcentage de cellules tumorales était bas (2%, 5%, 5%, 10% et 10%), et correspondaient à 2 prélèvements cytologiques (liquide pleural et aspiration bronchique), 1 biopsie bronchique et 2 prélèvements pulmonaires chirurgicaux incluant un ganglion lymphatique. Nous avons testé par une technique plus sensible (CAST PCR) les 3 échantillons DEL19 qui étaient retrouvés sauvages par l'analyse de fragment ; 1 seul de ces échantillons a été retrouvé muté (P3, Tableau 16), les 2 autres échantillons provenaient d'un seul et même patient (P16, Tableau 16) et restaient sauvages même avec la technique CAST. Tous les échantillons provenant de tumeurs mutées p.L858R, p.L861Q/p.T790M et p.G719A étaient contributifs et mutées (Tableau 16).

Tous les échantillons (N=153) ont été testés pour la pT790M, seule une patiente présentait cette mutation dès le diagnostic. Cette mutation était retrouvée dans tous les échantillons tumoraux de cette patiente (N=19) provenant de plusieurs localisations pulmonaires métastatiques, avec une intensité allélique similaire entre les mutations p.L861Q et p.T790M pour chacun des 19 échantillons (Tableau 16).

Tous les échantillons (N=39) provenant des 10 patients porteurs d'une tumeur *EGFR* et *KRAS* sauvages ont été retrouvés sauvages pour le gène *EGFR* (Tableau 17).

2- Homogénéité du statut mutationnel *EGFR* au sein de la tumeur primitive et entre la tumeur primitive et ses métastases thoraciques

Dans notre série, 22 des 40 patients avaient subi une résection chirurgicale complète de leur adénocarcinome permettant une classification selon les nouvelles recommandations IASLC/ATS/ERS. Tous les types architecturaux étaient représentés hormis le sous-type mucineux. La plupart des tumeurs possédaient une architecture lépidique (9/22) même si celle-ci n'était pas prédominante. Pour ces 22 adénocarcinomes, nous avons analysé différentes parties tumorales possédant différents types architecturaux et nous n'avons jamais retrouvé d'hétérogénéité des mutations *EGFR* malgré l'hétérogénéité architecturale.

Deux patients avaient des lésions pré-invasives (hyperplasie pneumocytaire atypique et adénocarcinome *in situ*), localisées à distance de l'adénocarcinome infiltrant. Ces lésions pré-invasives présentaient la même mutation *EGFR* que la forme infiltrante.

Pour 10 patients, nous avons analysé la tumeur primitive et ses métastases ganglionnaires (n=8) ou pleurales (n=2). Un seul patient avait un résultat discordant entre sa tumeur primitive et une de ces métastases ganglionnaires mais celle-ci comportait seulement 10% de cellules tumorales. Pour ce patient, l'autre métastase ganglionnaire, comportant 80% de cellules tumorales, présentait la mutation recherchée.

PATIENTS	Nombre et type d'échantillon analysé par patient					Résultat du génotypage EGFR			
	MUTATION	TUMEUR PRIMAIRE (résection chirurgicale, biopsie pulmonaire*, biopsie bronchique†	BIOPSIE PLURALE	GANGLION N+	CYTOLOGIE : (liquide pleural, aspiration bronchique*)	Echantillons contributifs	Concordance du statut EGFR	Echantillons non contributifs	Discordance du statut EGFR
P1	del19	7	0	0	0	7	7	0	1 (mais positif en CAST
P2	del19	2	0	0	0	2	2	0	
P3	del19	0	3	0	1(5%)	4	3	0	
P4	del19	0	4	0	1	5	5	0	
P5	del19	0	3	0	1	4	4	0	
P6	del19	1*+1*	0	0	0	2	2	0	
P7	del19	0	0	0	2	2	2	0	
P8	del19	1*+1*	0	0	0	2	2	0	
P9	del19	3	1	0	0	4	4	0	
P10	del19	0	3	0	0	3	3	0	
P11	del19	0	3	0	0	3	3	0	
P12	del19	0	3	0	0	2	2	1	
P13	del19	4	0	0	0	4	4	0	
P14	del19	2	0	0	0	2	2	0	
P15	del19	0	2	0	1	3	3	0	
P16	del19	1£+1£(10%)	0	0	1*(5%)	3	1	0	
P17	del19	3	0	0	0	3	3	0	
P18	del19	0	0	1	1*	1	1	1	
P19	del19	1+1*	0	0	0	2	2	0	
P20	p.G719	1	0	4	0	5	5	0	
P21	p.G719	5	0	2	0	7	7	0	
P22	ins20	3	0	1	0	4	4	0	
P23	ins20	0	2	0	0	2	2	0	
P24	ins20	3	0	2	0	4	4	1	
P25	ins20	0	2	0	0	2	2	0	
P26	ins20	3	0	0	0	3	3	0	
P27	ins20	2+1(2%)	0	1+1(10%)	0	4	2	1	
P28	p.L858	4	0	2	0	6	6	0	
P29	p.L858	1£+1£	0	0	0	2	2	0	
P30	p.L858	2	0	0	0	2	2	0	
P31	p.L858	3	0	0	0	3	3	0	
P32	p.L858	0	3	0	1	4	4	0	
P33	p.L858	0	3	0	0	3	3	0	
P34	p.L858	1£	1	0	1	3	3	0	
P35	p.L858	4	0	2	0	6	6	0	
P36	p.L858	2	0	1	0	3	3	0	
P37	p.L858	3	0	0	0	3	3	0	
P38	p.L858	3	0	0	0	3	3	0	
P39	p.L858	3	0	0	0	3	3	0	
P40	p.L861	19	0	0	0	19	19	0	

TABLEAU 16 : ANALYSE DE LA DISTRIBUTION DES MUTATIONS EGFR DANS 153 FRAGMENTS PROVENANT DE 40 PATIENTS ATTEINTS D'ADENOCARCINOME PULMONAIRE EGFR MUTE

Les échantillons non contributifs ne sont pas amplifiables. Les échantillons discordants sont sauvages alors que la mutation était attendue, ils sont surlignés en gris et sont accompagnés du pourcentage de cellules tumorales dans l'échantillon considéré.

PATIENTS	Nombre et type d'échantillons analysés par patient				Génotypage <i>EGFR</i> et <i>KRAS</i>			
	Tumeur primaire (exérèse chirurgicale)	Biopsie pleurale	Ganglion	Métastase	Echantillons contributifs	Statut <i>EGFR</i> WT concordant	Echantillons non contributifs	Statut <i>EGFR</i> WT discordant
P1	3	0	0	3	6	6	0	0
P2	3	0	1	0	4	4	0	0
P3	3	0	1	0	4	4	0	0
P4	4	0	0	0	4	4	0	0
P5	3	0	1	0	4	4	0	0
P6	4	0	0	0	4	4	0	0
P7	3	0	0	0	3	3	0	0
P8	0	2	0	0	2	2	0	0
P9	2	0	1	0	3	3	0	0
P10	3	0	2	0	5	5	0	0

TABLEAU 17 : GENOTYPAGE MULTISITE DES MUTATIONS *EGFR* ET *KRAS* DANS 39 FRAGMENTS PROVENANT DE 10 PATIENTS CONNUS POUR AVOIR UNE TUMEUR WT
WT : wild type (sauvage).

3- Analyse des mutations *EGFR* dans les prélèvements de petite taille

Nous avons analysé 20 prélèvements de petite taille (8 liquides pleuraux, 2 aspirations bronchiques, 5 biopsies pulmonaires sous-scanner, 5 biopsies bronchiques), 8 avaient un pourcentage inférieur à 15% de cellules tumorales. Sur les 20 prélèvements, 19 étaient contributifs dont 16 étaient mutés *EGFR*, seuls 3 échantillons étaient sauvages (1 liquide pleural, 1 aspiration bronchique et 1 biopsie bronchique), ils comportaient respectivement 5, 5 et 10% de cellules tumorales (Tableau 16).

4- Détermination du nombre de copies du gène *EGFR*

Le nombre de copies du gène *EGFR* (CN) a été déterminé dans 132/153 échantillons. Seuls 26/132 échantillons avaient un CN > 2,5 et 2 avec un CN > 5. La moitié des patients (18/40) avait une augmentation du CN dans au moins un de leur échantillon tumoral, un seul patient avait une augmentation du CN dans tous ces prélèvements tumoraux testés avec un CN >4 (Tableau 18).

Dans les échantillons avec un faible pourcentage de cellules tumorales ($\leq 10\%$, N=25), 5 ne permettaient pas de retrouver la mutation *EGFR* et 2 étaient non informatifs, aucun de ces prélèvements n'avait un nombre de copies du gène *EGFR* élevé. A l'opposé, sur les 18 échantillons restants, 4 avaient un CN $\geq 2,5$.

Nous avons ensuite étudié si l'augmentation de copies du gène était associée à une architecture particulière des adénocarcinomes. Chez 1 patient, l'augmentation de copie était retrouvée uniquement dans le contingent d'architecture solide et pas dans les autres contingents qui étaient de type lépidique (Figure 26). En revanche, dans les autres tumeurs comportant des contingents de haut grade (solide et micropapillaire), aucune augmentation du nombre de copie n'a été retrouvée. Finalement, parmi les 2 lésions pré-invasives (hyperplasie pneumocytaire atypique et adénocarcinome *in situ*), une présentait une augmentation du CN (CN=3,4).

Tous nos échantillons provenant de tumeurs sauvages ne montraient pas d'augmentation du CN.

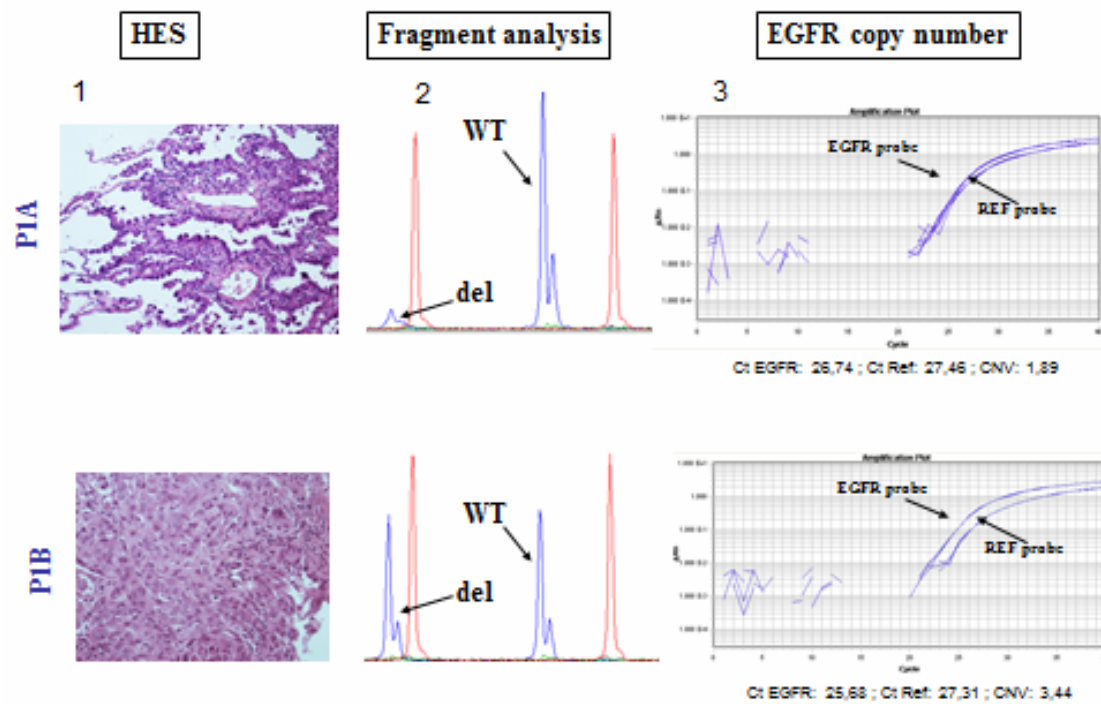


FIGURE 26 : ILLUSTRATION DES DIFFERENTS ASPECTS MOLECULAIRES (RATIO ALLELIQUE ET NOMBRE DE COPIE DU GENE) DE LA MUTATION DEL19 D'EGFR SELON LE SOUS-TYPE ARCHITECTURAL D'UN ADENOCARCINOME

1- coloration HES au grossissement x 100, 2- Analyse de fragment (rouge : marqueur de taille, bleu : échantillon testé), 3- Evaluation du nombre de copie du gène. Dans l'échantillon A, l'architecture est lépidique, la délétion est peu visible sur la technique d'analyse de fragment, cette délétion a été validée par la technique CAST ; le nombre de copie n'est pas augmenté (CNV : 1,89). Dans l'échantillon B, l'architecture est solide, la délétion de l'exon 19 est bien visible en analyse de fragment et il existe une augmentation du nombre de copie (CNV : 3,44).

Nombre et type d'échantillons analysés par patient						Résultats <i>EGFR</i> CN		
PATIENTS	MUTATION	Tumeur primaire (exérèse chirurgicale, biopsie pulmonaire*, biopsie bronchique†	Biopsie pleurale	Ganglion	CYTOLOGIE : liquide pleurale, aspiration bronchique*	<i>EGFR</i> CN≥2,5	<i>EGFR</i> CN<2,5	Echantillons non contributifs
P1	del19	7	0	0	0	5	2	
P2	del19	2	0	0	0		2	
P3	del19	0	3	0	1		3	1
P4	del19	0	4	0	1	1	3	1
P5	del19	0	3	0	1	1	3	
P6	del19	1*+1*	0	0	0	1	1	
P7	del19	0	0	0	2	1	1	
P8	del19	1*+1*	0	0	0	1	1	
P9	del19	3	1	0	0	1	3	
P10	del19	0	3	0	0		1	2
P11	del19	0	3	0	0	3		
P12	del19	0	3	0	0	1	2	
P13	del19	4	0	0	0		4	
P14	del19	2	0	0	0		2	
P15	del19	0	2	0	1		3	
P16	del19	1f+1f	0	0	1*		1	2
P17	del19	3	0	0	0	1	1	1
P18	del19	0	0	1	1*		1	1
P19	del19	1+1*	0	0	0		1	1
P20	p.G719A	1	0	4	0	1	2	2
P21	p.G719A	5	0	2	0		6	1
P22	ins20	3	0	1	0	2	2	
P23	ins20	0	2	0	0		2	
P24	ins20	3	0	2	0		4	1
P25	ins20	0	2	0	0	1	1	
P26	ins20	3	0	0	0		3	
P27	ins20	2+1	0	1+1	0		4	1
P28	p.L858R	4	0	2	0		6	
P29	p.L858R	1f+1f	0	0	0	1	1	
P30	p.L858R	2	0	0	0		2	
P31	p.L858R	3	0	0	0		3	
P32	p.L858R	0	3	0	1	2	2	
P33	p.L858R	0	3	0	0	1	1	1
P34	p.L858R	1f	1	0	1	1		2
P35	p.L858R	4	0	2	0		6	
P36	p.L858R	2	0	1	0		2	1
P37	p.L858R	3	0	0	0		2	1
P38	p.L858R	3	0	0	0	1	2	
P39	p.L858R	3	0	0	0		2	1
P40	p.L861Q/ p.T790M	19	0	0	0		18	1

TABLEAU 18 : ANALYSE DE LA DISTRIBUTION DU NOMBRE DE COPIE DU GENE *EGFR* DANS 153 FRAGMENTS PROVENANT DE 40 PATIENTS

Les échantillons non contributifs correspondent aux échantillons non amplifiables ou ceux dont le Ct >30.

Discussion

Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) ont modifié l'évolution des patients atteints d'un carcinome pulmonaire muté *EGFR*, améliorant la survie sans progression et les effets secondaires liés aux chimiothérapies conventionnelles (Sequist *et al.*, 2008). En pratique clinique, la présence d'une mutation *EGFR* est nécessaire pour prescrire en première ligne un ITK anti-*EGFR* (Santarpia *et al.*, 2013) (Kobayashi and Hagiwara, 2013). L'hétérogénéité des mutations *EGFR* au sein d'une même tumeur et entre la tumeur primitive, ses métastases et ses récurrences a été rapportée dans plusieurs études, essentiellement dans la population asiatique, elle pourrait être un obstacle majeur au diagnostic moléculaire et à la prescription de la thérapie ciblée (Jiang *et al.*, 2008) (Sakurada *et al.*, 2008) (Taniguchi *et al.*, 2008) (Chen *et al.*, 2012) (Honda *et al.*, 2012) (Shimizu *et al.*, 2012). Le Tableau 19 résume les différentes études et compare les populations étudiées et les techniques utilisées. Les principales différences incluent : les types histologiques testés, certains ont inclus des carcinomes épidermoïdes dont on sait qu'ils sont peu fréquemment mutés *EGFR* ; le taux de patients tabagiques ; les techniques utilisées et les mutations testées.

La question de l'hétérogénéité du gène *EGFR* est importante car les patients pouvant bénéficier d'un ITK anti-*EGFR* sont des patients porteurs de tumeurs mutées *EGFR* de stade avancé et dont le seul matériel disponible pour le diagnostic et pour l'analyse moléculaire est le plus souvent un prélèvement de petite taille, biopsique ou cytologique, provenant soit de la tumeur primitive soit le plus souvent de sites métastatiques (Jiang *et al.*, 2008) (Chen *et al.*, 2012) (Shimizu *et al.*, 2012) (Bai *et al.*, 2013) (Sun *et al.*, 2011). Ainsi, il est essentiel de confirmer que les prélèvements de petite taille, constitués par les cytologies (aspiration bronchique, liquide pleural) ou les biopsies (biopsies bronchiques ou percutanées sous-scanner), sont suffisants pour le diagnostic mais également pour l'analyse moléculaire.

Dans notre étude, nous avons eu l'occasion d'étudier la distribution des mutations et du nombre de copie du gène *EGFR* dans une population caucasienne de patients porteurs d'un adénocarcinome pulmonaire muté *EGFR*, soit dans différentes parties de la même tumeur primitive, soit dans différentes localisations métastatiques.

Article	Type histologique	Nombre d'échantillons	Tabagisme	Concordance TP/M	Analyse dans la TP	Concordance dans la TP	Techniques	Mutation	Metastases
Yatabe et al. 2011	ADC (77)	77		100			qPCR Analyse de fragment	L858R DEL19 INS20 719X	Ganglion
Sun et al. 2011	ADC (39), CE (31), ADSQ (6), CGC (4)	80	Oui (49) Non (31) Global	92,5% (74/80)			Séquençage direct	all	Ganglion
Wei et al. 2014	ADC (49) CE (1)	50	Oui (10) Non (40) Global	80% 97,5% 93% (47/50)			qPCR	45 hotspots	Ganglion
Bai et al. 2013	ADC (63) CE (10) ADSQ (5) Autre (7)	85 (45 EGFRmt 40 EGFRwt)			1431 foci 1238 foci (micro-dissection laser)	87,1%	ARMS	DXS EGFR mutation Kit	
Chang et al. 2011	ADC (34) CE (17) ADSQ (1) Autre (1)	56 (27 EGFRmt)	Oui (29) Non (23) Inconnu (4) Global	62% 70% 68% (38/56)			Séquençage direct	all	Ganglion
Schmid et al. 2009	ADC (96)	96 (7 EGFRmt)	Oui (74) Non (22) Global	14% (1/7)			Séquençage direct	L858R (3) DEL19 (3) INS20 (1)	Ganglion
Gow et al. 2009	ADC (42) CE (21) ADSQ (0) Autre (4)	67 (35 EGFRmt)	Oui (26) Non (41) Global	26%(9/35) seq 57%(20/35) ARMS			Séquençage direct et ARMS pour les cas discordants	all	Cerveau (25) Os (20) Autre (22)
Mattsson et al. 2012	ADC (6)	6			3 par tumeur	100%	Séquençage direct	L858R DEL19	
Kalikaki et al. 2008	ADC (20) CE (2) ADSQ (0) Autre (3)	25 (7 EGFRmt)	Oui (22) Non (3) Global	14% (1/7) 5 mutations are rare alterations (codons 692- 847-746-857)			Séquençage direct	all	Cerveau (3) Plèvre (5) Poumon (9) Surrénale (3) Os (2) Peau (1) Foie (1)
Matsumoto et al. 2006	ADC (19)	19 (12 EGFRmut)		100%			Séquençage direct	L858R DEL19	Cerveau (19)
Yatabe et al. 2011	ADC (50)	50 EGFRmt			3 par tumeur (50) 100 par tumeur (5)	100% 100%	qPCR Analyse de fragment	L858R DEL19	

TABLEAU 19 : SCHEMA DE LA REVUE DE LA LITTERATURE CONCERNANT LA DISTRIBUTION DES MUTATIONS *EGFR*

TP : tumeur primitive, M : métastase, ARMS : Amplification Refractory Mutation System.

Comme attendu chez les caucasiens, la fréquence des mutations *EGFR* était de 15 %, essentiellement représentée par des délétions dans l'exon 19 ou par une mutation ponctuelle dans l'exon 21 (p.L858R) (Goto et al., 2012). La mutation de résistance p.T790M a été analysée dans les 153 échantillons des 40 patients étudiés, nous l'avons retrouvé uniquement dans une seule tumeur, au moment du diagnostic, cette tumeur présentait une double mutation p.L861Q et p.T790M. Il a été suggéré que la mutation p.T790M était présente sous forme de sous clones dans les tumeurs avant traitement par ITK (Ma et al., 2011). Pour notre patient, la proportion de ces deux mutations, évaluée par le Ct, était équivalente, suggérant une distribution homogène de ces deux altérations et non la présence d'un sous-clone.

Sur les 153 échantillons analysés, 149 étaient interprétables, 5 de ces 149 échantillons étaient pauvres en cellules tumorales et présentaient un génotype discordant, c'est-à-dire qu'ils étaient sauvages au lieu d'être mutés. Les mutations attendues concernaient soit des DEL19 (N=3) soit des INS20 (N=2) or nous savons que le seuil de détection de la technique d'analyse de fragment ($\geq 10\%$) est moins sensible que celui de la technique de discrimination allélique (1%) (Didelot *et al.*, 2012), ce qui peut suggérer que ces résultats pouvaient être des faux négatifs. C'est pour cela que nous avons testé les 3 échantillons DEL19 négatifs provenant de deux patients différents, par la technique CAST qui est réputée plus sensible. Sur ces 3 échantillons DEL19 négatifs en analyse de fragment, un seul a été retrouvé muté par la technique CAST. Les 2 autres échantillons provenaient d'un autre patient qui avait deux tumeurs pulmonaires primitives synchrones (adénocarcinome et carcinome épidermoïde), ce qui pourrait expliquer cette situation équivoque.

Nous avons utilisé comme contrôle, des patients (N=10) porteurs de tumeurs sauvages pour les gènes *EGFR* et *KRAS*. Aucune mutation *EGFR* n'a été retrouvée dans les 39 fragments tumoraux testés chez ces 10 patients, de même il n'existait pas d'augmentation du nombre de copies du gène.

Ainsi, nos résultats suggèrent que la distribution des mutations *EGFR* dans une tumeur et ses métastases thoraciques est relativement homogène. Notre travail n'exclut pas formellement la présence de sous-clones minoritaires cependant nous pensons que leur présence n'affecte pas la détection des mutations *EGFR* pour le diagnostic moléculaire de routine.

Si des discordances existent au sein d'une même tumeur, elles sont principalement liées à des différences de sensibilité des techniques de détection des mutations utilisées et au pourcentage de cellules tumorales dans les échantillons testés. Nous avons testé 38 échantillons sur les 153 par la technique de séquençage direct, 23 étaient concordants, 3 discordants et 12 non interprétables. Nous avons alors stoppé la comparaison de cette technique avec nos techniques

de référence car elle nous semblait moins appropriée pour le diagnostic moléculaire en routine car elle était moins sensible que nos techniques usuelles.

Le seuil de détection des techniques est sujet à controverse, au dessus de 50 % il est licite de rendre un résultat négatif (ou sauvage) sans risque de faux négatif alors que ce n'est pas le cas sous le seuil de 10% (Ellison *et al.*, 2013). Dans notre étude, sur les 22 échantillons contributifs possédant $\leq 10\%$ de cellules tumorales, 17 étaient mutés, ce qui démontre qu'un grand nombre de prélèvements pauvres en cellules tumorales peut convenir pour l'analyse moléculaire.

Nous avons ensuite testé si l'augmentation du nombre de copie du gène *EGFR* (CN) pouvait influencer la détection des mutations, en particulier dans les prélèvements pauvres en cellules tumorales. En effet, le ratio allélique muté/sauvage dépend non seulement du pourcentage en cellules tumorales mais aussi du nombre de copie de l'allèle muté. Nous avons retrouvé que le nombre de copie était hétérogène entre les différentes parties d'une même tumeur et qu'un faible pourcentage en cellule tumorale était probablement « récupéré » par un nombre élevé de copie de l'allèle muté. Au contraire, un grand nombre de cellule tumorale peut masquer un faible ratio de l'allèle muté/allèle sauvage. Comme Yakabe *et al.*, nous pensons que les différences de sensibilité des techniques couplées à la différence en nombre de copies du gène *EGFR* peuvent expliquer l'hétérogénéité des mutations *EGFR* trouvée dans certaines études.

Ensuite, nous avons voulu savoir si l'aspect morphologique hétérogène des tumeurs était associé à une différence du nombre de copie du gène. Plusieurs études avaient démontré une variation du CN du gène *EGFR* en fonction du sous-type architectural de l'adénocarcinome (Yatabe *et al.*, 2011) (Grob *et al.*, 2013). Dans notre étude, une seule tumeur possédait une augmentation du CN, restreint au contingent de haut grade (architecture solide) alors que le contingent de grade intermédiaire (lépidique) n'avait pas d'augmentation du CN, cependant cette donnée n'était pas généralisable car d'autres contingents classés en haut grade (solide ou micropapillaire) ne présentaient pas d'augmentation du CN et au contraire une lésion préinvasive présentait une augmentation du CN. Ces résultats suggèrent donc que le rôle de l'amplification du gène *EGFR* dans la progression tumorale n'est pas directement lié au grade histologique.

Enfin, l'hétérogénéité des mutations *EGFR* a également été décrite chez les patients traités par ITK et ayant développé une résistance secondaire, comme c'est le cas avec la mutation p.T790M (Taniguchi *et al.*, 2008) (Chen *et al.*, 2012) (Ma *et al.*, 2011). Dans notre série qui concerne des patients non traités par ITK, un seul patient présentait cette mutation au diagnostic et il n'existait pas d'hétérogénéité au sein des 19 échantillons tumoraux testés.

Conclusion

Ces données rétrospectives provenant de tumeurs mutées *EGFR* testées dans des conditions de routine valident le diagnostic moléculaire à partir de prélèvements de petite taille (cytologie et biopsie) et quel que soit le site, primitif ou métastatique testé (ganglion métastatique ou localisation pleurale), pourvu que le pourcentage de cellules tumorales soit satisfaisant (>10%). L'impact clinique de l'analyse du nombre de copies du gène *EGFR* reste à être évalué.

PARTIE III : Analyse de l'impact des caractéristiques morphologiques et moléculaires des cellules tumorales sur leur environnement immunitaire dans les adénocarcinomes pulmonaires

Introduction

Les cellules immunitaires sont impliquées dans la surveillance des tumeurs et la présence de certaines de ces cellules au sein des tumeurs est associée à une meilleure survie dans la majorité des tumeurs primitives, y compris dans les carcinomes non à petites cellules. Notre équipe a démontré le rôle bénéfique sur la survie à long terme de la présence au sein de la tumeur, d'une densité élevée de cellules dendritiques matures (CD) chez des patients atteints d'un carcinome pulmonaire non à petites cellules, ceci tant dans les stades précoces que dans les stades avancés (Dieu-Nosjean et al., 2008; Goc et al., 2014). Si plusieurs études ont démontré une association entre la forte densité de lymphocytes T CD8+ et une meilleure survie des patients atteints d'un carcinome pulmonaire (Al-Shibli et al., 2008, Ruffini et al., 2009, Suzuki et al., 2011), notre équipe a démontré que la présence de nombreuses cellules dendritiques matures, situées dans les structures lymphoïdes tertiaires, était associée à une orientation cytotoxique (LT CD8+) de la réponse immunitaire (Goc et al., 2014). Ainsi, l'organisation de l'environnement immunitaire intra-tumoral est un système complexe faisant intervenir de nombreuses cellules immunitaires dont les rôles sont différents et complémentaires, et qui sont probablement en étroite relation avec les cellules tumorales.

Par ailleurs, les adénocarcinomes pulmonaires sont des tumeurs très hétérogènes morphologiquement, qui peuvent présenter plusieurs types architecturaux au sein d'une même tumeur. Comme il l'a été démontré par notre équipe et par d'autres, l'architecture prédominante des adénocarcinomes a une valeur pronostique importante quel que soit le stade de la tumeur (Mansuet-Lupo et al., 2014, Russell *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2013; Tsuta *et al.*, 2013; Warth *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013; Yoshizawa *et al.*, 2011; Yoshizawa *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). Dans les adénocarcinomes pulmonaires, les mutations les plus fréquentes sont situées sur les gènes *KRAS* et *EGFR*, représentant respectivement, 25% et 15% des adénocarcinomes dans la population caucasienne, ces mutations étant exclusives. Le lien entre certains types architecturaux des adénocarcinomes et certaines altérations moléculaires est

maintenant bien établi (Mansuet-Lupo et al., 2014, Li *et al.*, 2013 ; Shim *et al.*, 2011 ; Song *et al.*, 2013 ; Sun *et al.*, 2012 ; Warth *et al.*, 2013, Tsuta *et al.*, 2013; Yoshizawa *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2012). La présence de telles altérations pourrait générer des protéines anormales qui seraient ensuite reconnues par le système immunitaire et favoriseraient une réponse anti-tumorale, comme cela a été suggéré dans les carcinomes colorectaux liés à une instabilité des microsatellites (Tougeron et al., 2013, Greenson et al., 2009, Smyrk et al., 2001, Michael-Robinson et al., 2001). En effet, les multiples erreurs mutationnelles causées par l'absence de protéine de réparation de l'ADN efficace, génèrent des néoantigènes potentiellement immunogènes comme cela fut démontré avec le gène TGF β 2 codant pour le récepteur du TGF β qui est muté dans plus de 90% des cancers du côlon avec instabilité des microsatellites (Saeterdal et al., 2001). L'activation de lymphocytes T spécifiques de ces néoantigènes immunogènes pourrait alors jouer un rôle primordial dans l'élimination des cellules tumorales et donc refléter, par l'infiltrat lymphocytaire important, le meilleur pronostic de ces tumeurs (Popat *et al.*, 2005 ; Schwitalle Y *et al.*, 2008).

Dans les tumeurs pulmonaires, certains auteurs ont démontré des associations entre la présence de cellules immunitaires intra-tumorales et le statut mutationnel de ces tumeurs. En effet, Rekhtman *et al.*, ont démontré que les adénocarcinomes pulmonaires mutés *KRAS* étaient plus souvent infiltrés en cellules immunitaires que les autres tumeurs, soit sauvages pour *EGFR* et *KRAS* ($p=0,01$), soit mutées *EGFR* ($p=0,038$) (Rekhtman et al., 2013). A l'inverse, Dacic *et al.* retrouvaient une faible infiltration en cellules immunitaires dans les tumeurs *EGFR* mutées (Dacic et al., 2010). Cependant, ces deux articles, ne précisait ni la nature de ces cellules immunitaires ni leur densité car ils n'utilisaient ni immunophénotypage ni analyse d'image pour quantifier ces cellules. Ces auteurs ont simplement rapporté une estimation de l'ensemble des populations immunitaires sur une lame colorée à l'HES.

Dans ce travail, nous avons eu l'opportunité d'étudier l'impact de certaines caractéristiques des cellules tumorales, en particulier le statut mutationnel des gènes *EGFR* et *KRAS*, sur la densité des cellules dendritiques matures et des lymphocytes T CD8⁺ au sein des adénocarcinomes pulmonaires de tous stades. Ceci dans l'objectif de mieux comprendre les interactions entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires du stroma tumoral.

Ainsi, nous avons analysé par étude immunohistochimique la densité de lymphocytes T CD8⁺ et de cellules dendritiques matures (CD-LAMP⁺) intra-tumoraux dans une cohorte d'adénocarcinomes pulmonaires opérés, pour laquelle nous avons de nombreuses données cliniques, moléculaires et histologiques (Mansuet-Lupo et al., 2014). Nous avons ainsi étudié : (1) l'association de certaines caractéristiques cliniques et histologiques avec la

présence de ces deux populations immunitaires ; (2) l'association des anomalies moléculaires *EGFR* et *KRAS* avec la densité de ces deux types de cellules immunitaires ; (3) l'impact pronostique de ces cellules immunitaires sur la survie globale.

Patients et méthodes

Patients

Nous avons inclus tous les patients opérés d'un adénocarcinome pulmonaire, dans un but curatif, de manière consécutive, dans le service de chirurgie thoracique de l'Hôtel Dieu Paris, pendant la période 2001-2005. Les patients ayant reçu un traitement néoadjuvant (chimiothérapie et/ou radiothérapie), et ceux dont la survie et les données immunitaires n'étaient pas connues ont été exclus. Les caractéristiques cliniques de ces patients ont été décrites précédemment (Mansuet-Lupo et al., 2014). Ainsi, nous avons inclus 331 patients. Cette étude a été conduite selon les recommandations décrites dans la déclaration d'Helsinki avec l'approbation du comité d'éthique local (CPP Ile de France II, n° 2008-133 and 2012 06-12).

Analyse histologique

Toutes les lames tumorales de ces 331 adénocarcinomes pulmonaires ont été réanalysées (1 à 7 par tumeur) indépendamment par deux pathologistes (DD et AML), dans le but de déterminer l'architecture tumorale prédominante selon la classification IASLC/ATS/ERS (Travis *et al.*, 2011). Pour les cas discordants entre les 2 pathologistes (n=7), les lames ont été revues conjointement jusqu'à consensus. Tous les adénocarcinomes ont été gradés selon leur architecture prédominante, comme suit : bas grade (AIS, AIM); grade intermédiaire (lépidoïde, papillaire ou acinaire prédominant); et haut grade (solide, micro-papillaire, mucineux ou solide avec contingent de cellules en bague à chignon prédominant) (Yoshizawa *et al.*, 2011). L'expression du TTF1 (Thyroid Transcriptional Factor 1, clone SP24 de Novocastra) a été analysée pour les 331 adénocarcinomes. Nous avons analysé également le degré de l'infiltration pleurale et la présence ou non d'embolies vasculaires. Le stade des tumeurs a été requalifié selon la 7ème classification TNM 2009 (Sobin and Compton, 2010).

Analyse moléculaire

Pour chaque tumeur, le bloc inclus en paraffine le plus richement tumoral, c'est-à-dire renfermant au moins 20% de cellules tumorales, a été sélectionné pour l'analyse moléculaire. L'ADN génomique a été extrait à partir du bloc fixé et inclus en paraffine en utilisant le kit commercial (illustra™ DNA extraction kit BACC2, GE Healthcare). Les altérations moléculaires communes des gènes *EGFR* (exon 19 deletions (DEL19), exon 20 insertions (INS20) et p.L858R) et *KRAS* (p.G12A, p.G12C, p.G12R, p.G12V, p.G12S, p.G12D et p.G13D), ont été analysées grâce à l'analyse de fragment pour les insertions et délétions et en utilisant les sondes Taqman pour les mutations ponctuelles, comme déjà décrit par l'équipe (Didelot *et al.*, 2012). Chaque réaction est réalisée en duplicate dans un volume final de 5µl avec le kit Gene Expression Master Mix (Lifetechnologies) utilisant le thermocycleur 7900HT (Applied Biosystems, LifeTechnologies).

Analyse du microenvironnement immunitaire

Pour chaque tumeur, le bloc tumoral inclus en paraffine le plus infiltré en cellules immunitaires, déterminée à partir de la coloration HES standard, a été sélectionné. Une étude immunohistochimique utilisant les anticorps anti-CD3 (clone A0452, Dako), anti-DC-Lamp (clone 1010E1.01, Dendritics) et anti-CD8 (clone SP16, Springbioscience) a été effectuée comme déjà décrite par notre équipe (Goc *et al.*, 2014). Le marquage par l'anticorps anti-CD3 a été couplé à l'anti-DC-Lamp pour faciliter le comptage des cellules dendritiques matures qui se situent préférentiellement dans les structures lymphoïdes tertiaires riches en lymphocytes T CD3+. Puis chacune des lames marquées ont été scannées grâce au nanozoomer (Hamamatsu) et au logiciel NDPview. Enfin, le comptage des cellules immunitaires a été effectué grâce au programme calopix de Tribvn ; le comptage des cellules dendritiques matures a été réalisé manuellement alors que l'énumération des lymphocytes CD8+ est semi-automatisée grâce au logiciel calopix (Tribvn). Le comptage est exprimé en nombre de cellules/mm². Nous avons ainsi évalué la densité des cellules dendritiques pour 323 tumeurs et la densité des lymphocytes CD8 pour 221 tumeurs. Chacun des comptages a été vérifié par deux observateurs indépendants.

Analyse statistique

Nous avons utilisé le test de Mann-Whitney pour comparer la densité des cellules immunitaires dans les différentes tumeurs. Pour évaluer la densité des cellules immunitaires, la valeur de p a été déterminée grâce à l'utilisation d'un seuil qui permettait de séparer au mieux les deux groupes (densité élevée et densité basse) de patients selon leur survie globale. Le seuil optimal pour les DC-Lamp+ était de 1,37 cellules/mm² et de 303 cellules/mm² pour les CD8+. Puisque les valeurs des p obtenues auraient pu être surestimées, la valeur du p pour la survie globale a été corrigée par la formule de Altman *et al* (Altman et al., 1994).

Les associations statistiques entre les caractéristiques cliniques, le statut moléculaire ou les densités en cellules immunitaires ont utilisé le test chi² ou de Fisher pour les variables catégoriques et le test de Wilcoxon pour les variables continues. Le taux de survie a été calculé en utilisant la méthode de Kaplan–Meier, et les différences ont été analysées grâce au log-rank test.

Toutes les variables associées à la survie ayant un $p < 0,05$ à l'analyse univariée ont été utilisées pour l'analyse multivariée (hormis les stades T et N déjà inclus dans le stade TNM). Une valeur de $p < 0,05$ est considéré comme significative. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel R (<http://www.r-project.org/>).

Résultats

Analyse de la densité des lymphocytes T CD8+ et des cellules dendritiques matures dans les adénocarcinomes pulmonaires en fonction des caractéristiques cliniques et histologiques.

La médiane des densités des cellules dendritiques matures (CD) était de 3.88 cellules/mm² avec des valeurs extrêmes allant de 0 à 31,49. La médiane des densités des lymphocytes CD8+ totaux était de 464 cellules/mm² avec des valeurs extrêmes allant de 0 à 2650.

Les CD matures étaient retrouvées au sein des follicules lymphoïdes B, dans les régions riches en lymphocytes T (Figure 27), alors que les lymphocytes T CD8+ étaient situés à distance des follicules lymphoïdes.

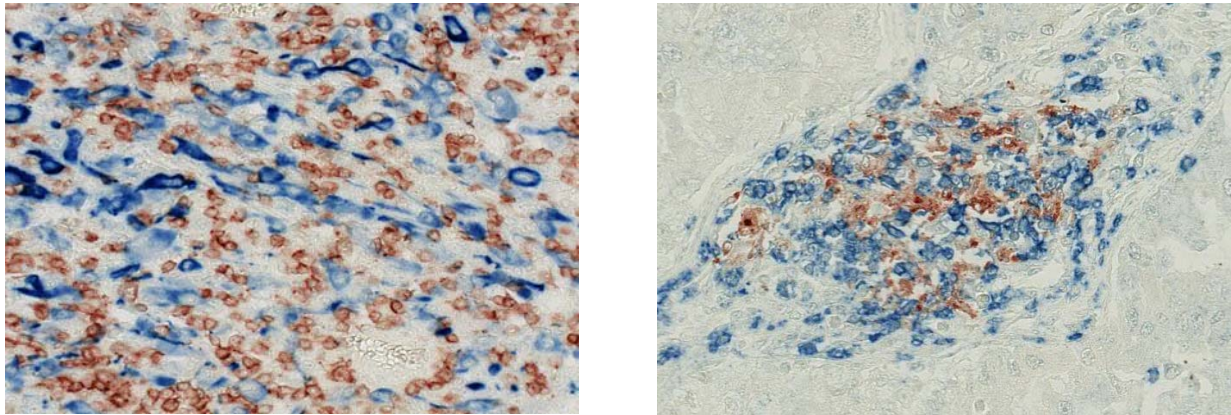


FIGURE 27 : PHOTOS D'IMMUNOMARQUAGE METTANT EN EVIDENCE LES CELLULES CD8+ ET LES CELLULES DENDRITIQUES MATURES DC-LAMP+ DANS UN ADENOCARCINOME PULMONAIRE.

A : infiltration de cellules CD8+ (rouge) parmi les cellules tumorales marquées par l'anti-AE1/AE3 (bleu) dans une tumeur richement infiltrée. B : infiltration de nombreuses cellules dendritiques matures DC-LAMP+ (rouge) au sein d'une zone riche en lymphocytes T CD3+ (bleu).

Pour étudier les associations entre la densité des cellules dendritiques matures (CD) et des cellules CD8+, et les caractéristiques cliniques et histologiques des patients, nous avons déterminé un seuil à partir de la survie globale permettant de constituer deux groupes de forte et de faible densité en cellules immunitaires. Le seuil permettant de séparer ces deux groupes était de 1,37 cellules/mm² pour les DC-Lamp et de 303 cellules/mm² pour les CD8. Nous avons observé 130 tumeurs avec une forte densité en cellules CD8+ (CD8 élevé), 91 tumeurs avec une faible densité en cellules CD8+ (CD8 bas), 196 tumeurs avec une forte densité de CD (DC-Lamp élevé) et 127 tumeurs avec une faible densité de CD (DC-Lamp bas). Une forte densité des cellules CD8+ (CD8 élevé) était plus fréquemment retrouvée parmi les tumeurs riches en CD (DC-Lamp élevé) que dans les tumeurs pauvres en CD (DC-Lamp bas) ($p=3.10^{-7}$), de même les tumeurs DC-Lamp élevé étaient plus fréquemment CD8 élevé ($p=1.10^{-6}$).

En utilisant ces seuils, il existait une association entre la densité en CD et le stade pT ($p=0,008$) et la classification pTNM ($p=0,01$). En effet, les tumeurs avec un stade pT et pTNM élevé avaient une densité en cellules dendritiques plus faible. Il existait une association entre le tabagisme et la densité en cellules CD8+ ; en effet, les patients tabagiques avaient une tumeur plus souvent infiltrée en cellules CD8+ ($p=0,01$). Les patients porteurs d'une BPCO possédaient des tumeurs fortement infiltrées en cellules CD8+ et faiblement infiltrées en CD même si cette donnée n'atteignait pas la significativité. Aucune différence significative avec l'aspect histologique des tumeurs n'était retrouvée avec ces deux types de cellules immunitaires (Tableaux 20 et 21).

Pour s'affranchir du biais lié à la présence d'un seuil qui dépendait de la survie globale, nous avons étudié ces mêmes associations cliniques et histologiques en utilisant les densités des cellules immunitaires en tant que variables continues. Il a été retrouvé une association significative de la densité des CD avec le sexe, le stade pTNM et le tabac. Le sexe féminin ($p=0,005$), l'absence ou le faible tabagisme ($p=0,02$) et le faible stade TNM ($p=0,01$) étaient associées à la présence d'une plus forte densité en CD. Il existait une association significative entre la densité en cellules CD8+ et le tabagisme, ($p=0,009$) ; en effet, les patients tabagiques possédaient une tumeur plus fortement infiltrée en cellules CD8+.

Analyse de la densité des lymphocytes T CD8+ et des cellules dendritiques matures en fonction du statut mutationnel *EGFR* et *KRAS* des tumeurs.

En utilisant les valeurs de l'infiltrat immunitaire en tant que variables continues, la densité en CD était significativement plus élevée dans les tumeurs *EGFR* mutées comparée à celle des tumeurs sauvages (sans mutation *EGFR* ni *KRAS* (WT)) ($p=0,004$), et elle était significativement plus faible dans les tumeurs *KRAS* mutées comparée à celle des tumeurs WT ($p=0,01$). En revanche, la densité en cellules CD8+ dans les tumeurs *EGFR* ($p=0,2$) ou *KRAS* mutées ($p=0,3$) n'était pas significativement différente de celle des tumeurs WT (Figure 28).

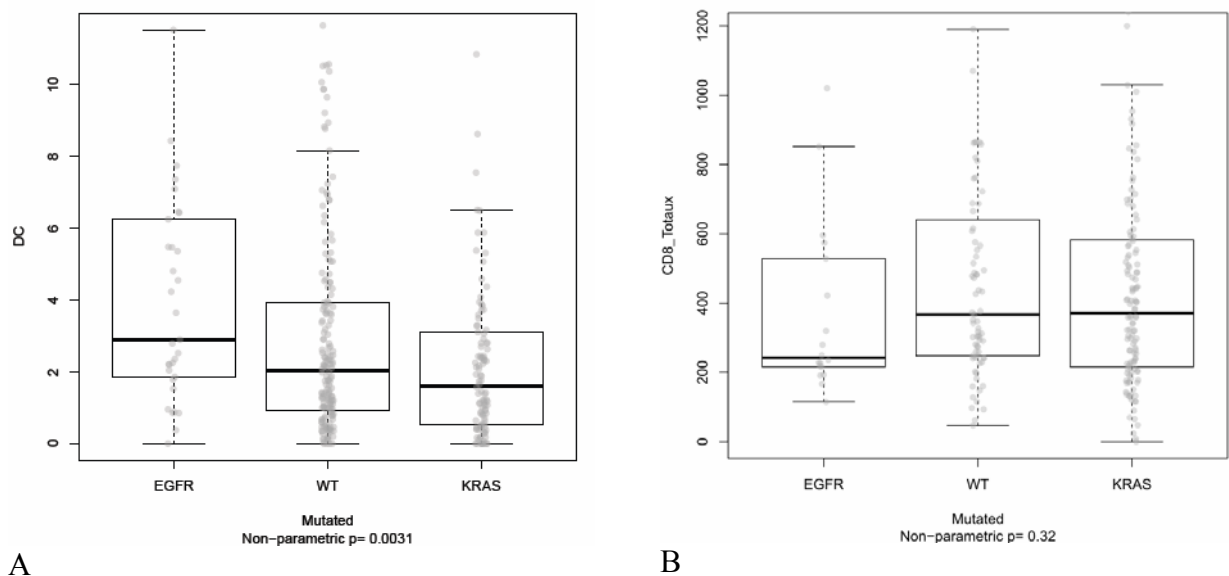


FIGURE 28 : BOX PLOT REPRESENTANT LA DISTRIBUTION DES DENSITES DES CELLULES DENDRITIQUES MATURES ET DES LYMPHOCYTES CD8+ EN FONCTION DU STATUT MUTATIONNEL *KRAS* ET *EGFR*.

(A) Densité en cellules dendritiques matures en fonction du statut *EGFR* muté, *KRAS* muté ou sauvage (WT) (B) Densité en cellules CD8+ en fonction du statut *EGFR* muté, *KRAS* muté ou sauvage (WT). WT : sauvages (non mutés ni *EGFR* ni *KRAS*), DC : cellules dendritiques matures, CD8 : lymphocytes T CD8+.

	Total n = 323	DC-LAMP bas n = 127	DC-LAMP élevé n = 196	P-value
Homme	230 (71%)	97 (76%)	133 (68%)	ns
Age médiane [range]	61 [19-83]	61 [19-83]	61 [31-83]	ns
Tabac paquet-année médiane [range]	40 [0-100]	40 [0-100]	40 [0-100]	ns
BPCO (oui -non)	125 (43%) - 167 (57%)	53 (48%) - 58 (52%)	72 (38%) - 109 (62%)	ns
Lobectomie - Pneumonectomie	299 (92%) - 24 (8%)	115 (90%) - 12 (10%)	184 (94%) - 12 (6%)	ns
Grade Histologique				
Grade intermédiaire	222	85	137	ns
Haut grade	100	41	59	
TTF1 (oui -non)	291 (90%) - 32 (10%)	113 (89%) - 14 (11%)	178 (90%) - 18 (10%)	ns
Invasion pleurale (oui -non)	183 (57%) - 140 (43%)	79 (62%) - 48 (38%)	104 (53%) - 92 (47%)	ns
Embols vasculaires (oui -non)	178 (55%) - 128 (41%)	71 (55%) - 49 (45%)	107 (66%) - 79 (34%)	ns
Stade (tumeur)				
pT1	80	23	57	
pT2	154	58	96	0,008
pT3-pT4	89	46	43	
Stade (ganglion)				
pN0	222	81	141	ns
pN1	53	22	31	
pN2	48	24	24	
Stade TNM				
I	155	48	107	
II	85	38	47	0,01
III-IV	83	41	42	
Statut moléculaire				
<i>EGFR</i> ^{Mut}	33	6	27	0,02
<i>KRAS</i> ^{Mut}	110	50	60	ns
<i>EGFR</i> ^{WT} <i>KRAS</i> ^{WT}	180	71	109	

TABLEAU 20 : CARACTERISTIQUES CLINIQUES, PATHOLOGIQUES ET MOLECULAIRES DES PATIENTS ATTEINTS D'UN ADENOCARCINOME PULMONAIRE EN FONCTION DE LA DENSITE EN CELLULES DENDRITIQUES MATURES DC-LAMP+

Le seuil pour discriminer les tumeurs DC-LAMP élevé des tumeurs DC-LAMP bas est de 1,37 cellules/mm²). BPCO: bronchopneumopathie chronique obstructive. ns: non significatif. na : non applicable.

	Total n = 221	CD8 bas n = 91	CD8 élevé n = 130	P-value
Homme	162 (73%)	62 (68%)	100 (77%)	ns
Age médiane [range]	60 [19-83]	62 [19-82]	60 [40-83]	ns
Tabac paquet-année médiane [range]	40 [0-100]	35 [0-100]	45 [0-90]	0,01
BPCO (oui -non)	85 (41%) - 121 (59%)	28 (34%) - 55 (66%)	57 (46%) - 66 (54%)	ns
Lobectomie - Pneumectomie	204 (92%) - 17 (8%)	83 (91%) - 8 (9%)	121 (93%) - 9 (7%)	ns
Grade Histologique				
Grade intermédiaire	140	59	81	ns
Haut grade	80	31	49	
TTF1 (oui -non)	196 (89%) - 25 (11%)	81 (89%) - 10 (11%)	115 (88%) - 15 (12%)	ns
Invasion pleurale (oui -non)	129 (58%) - 92 (42%)	51 (56%) - 40 (44%)	78 (60%) - 52 (40%)	ns
Embols vasculaires (oui -non)	124 (59%) - 86 (41%)	48 (54%) - 40 (62%)	76 (62%) - 46 (38%)	ns
Stade (tumeur)				
pT1	51	18	33	
pT2	112	47	65	ns
pT3-pT4	58	26	32	
Stade (ganglion)				
pN0	150	62	88	
pN1	34	9	25	ns
pN2	37	20	17	
Stade TNM				
I	107	45	62	
II	59	18	41	ns
III-IV	55	28	27	
Statut moléculaire				
<i>EGFR</i> ^{WT} <i>KRAS</i> ^{WT}	128	51	77	ns
<i>KRAS</i> ^{Mut}	75	29	46	ns
<i>EGFR</i> ^{Mut}	18	11	7	

TABLEAU 21 : CARACTERISTIQUES CLINIQUES, PATHOLOGIQUES ET MOLECULAIRES DES PATIENTS ATTEINTS D'UN ADENOCARCINOME PULMONAIRE EN FONCTION DE LA DENSITE EN LYMPHOCYTES CD8+

Le seuil pour discriminer les tumeurs CD8 élevé des tumeurs CD8 bas est de 303 cellules/mm². BPCO: bronchopneumopathie chronique obstructive. ns: non significatif. na : non applicable.

L'impact pronostique de la densité des lymphocytes CD8+ et des cellules dendritiques matures varie en fonction du profil moléculaire des tumeurs

La survie globale à 5 ans était de 52.7% (IC: 46.4-59.7) pour l'ensemble des 331 adénocarcinomes pulmonaires opérés. A l'analyse univariée, les variables cliniques et histologiques associées à la survie globale étaient l'âge ($p=0.003$), le type de résection ($p=0.02$), le pT ($p=6,5.10^{-8}$), le pN ($p=1,3.10^{-6}$); le stade TNM 2009 ($p=2.10^{-7}$), le grade histologique ($p=0,002$), l'infiltration pleurale ($p=0,01$) et les embolies vasculaires ($p=0.002$).

Concernant l'infiltrat en CD et en cellules CD8, une forte densité en cellules dendritiques matures et en lymphocytes CD8+ était associée à une meilleure survie globale ($p=0,004$ et $p=0,02$, respectivement). La combinaison de ces deux marqueurs a révélé qu'une faible densité de CD matures et de cellules CD8+ (groupe DC-Lamp bas/CD8 bas) était associée au pronostic le plus sombre (survie à 5 ans : 28%). A l'inverse, une forte infiltration en CD matures et en cellules CD8+ (groupe DC-Lamp élevé/CD8 élevé) était corrélée au meilleur pronostic vital (survie à 5 ans : 66%). Enfin, les patients du groupe DC-Lamp bas/CD8 élevé ou DC-Lamp élevé/CD8 bas présentaient un pronostic intermédiaire avec une médiane de survie significativement plus faible par rapport aux patients DC-Lamp élevé/CD8 élevé (survie à 5 ans : 51%).

A l'analyse multivariée (modèle incluant le grade, le stade TNM, l'âge, le type de résection, l'invasion pleurale, les embolies vasculaires et les densités en CD et en cellules CD8+), les facteurs pronostiques indépendants étaient l'âge, le type de résection, le stade TNM, le grade histologique, l'infiltrat en CD et l'infiltrat en cellules CD8+ (Tableau 22, Figure 29).

Dans un second temps, nous avons analysé la valeur pronostique de l'infiltrat en CD et en cellules CD8+ en fonction du statut mutationnel *KRAS* ou *EGFR*. Préalablement, nous avons démontré que le statut mutationnel *KRAS* ou *EGFR* n'était pas pronostique dans l'ensemble de la population d'adénocarcinome (partie I de cette thèse).

Dans la population comportant uniquement les tumeurs sauvages pour les gènes *KRAS* et *EGFR*, la densité des CD était pronostique ($p=0,027$), alors que la densité des CD8 n'était pas pronostique ($p=0,3$) (Figure 30).

Dans les tumeurs *KRAS* mutées, la densité en CD matures n'était pas pronostique ($p=0,4$), alors que la densité en cellules CD8+ l'était ($p=0,003$) (Figure 30). Dans les tumeurs *EGFR* mutées, le nombre de patient n'était pas suffisant pour obtenir des valeurs significatives, d'autant que la grande majorité (27/32) des tumeurs *EGFR* mutées était riche en CD (DC-Lamp élevé).

Paramètres	Hazard Ratio	P-value
Age (années)	1.03	0.0006
Type de résection		
Pneumonectomie	1.9	0.04
Lobectomie	REF	
Stade TNM		
I	REF	
II	1.4	0.1
III-IV	2.1	0.002
Grade Histologique		
Intermédiaire	REF	0.001
Haut	1.81	
Embols Vasculaires		
Oui	1.4	0.08
Non	REF	
Invasion pleurale		
Oui	1.3	0.2
Non	REF	
Infiltrat CD		
Bas	1.91	0.001
Elevé	REF	
Infiltrat CD8+		
Bas	1.64	
Elevé	REF	0.01

TABLEAU 22 : ANALYSE MULTIVARIEE DE LA SURVIE GLOBALE

REF: paramètre de référence utilisé dans l'analyse de Cox. CD : cellules dendritiques matures. L'âge a été étudié comme une variable continue.

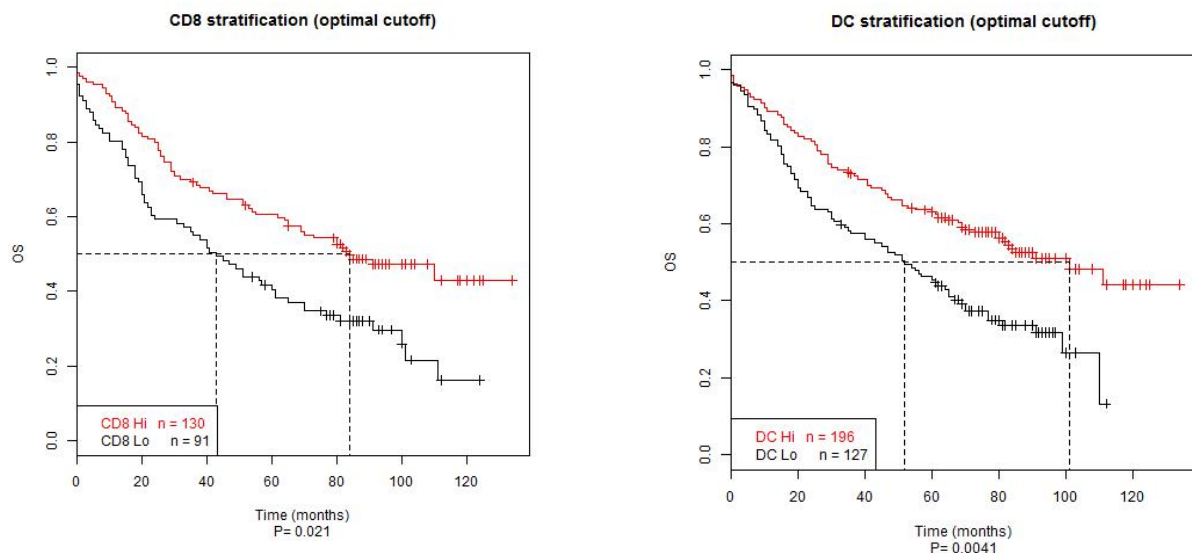


FIGURE 29 : COURBE DE KAPLAN-MEIER DE LA SURVIE GLOBALE DES ADENOCARCINOMES SELON LA DENSITE EN CELLULES DENDRITIQUES MATURES ET LA DENSITE EN CELLULES CD8+ (LOG-RANK TEST)

DC : cellules dendritiques matures, Hi : élevé, Lo : bas, OS : survie globale

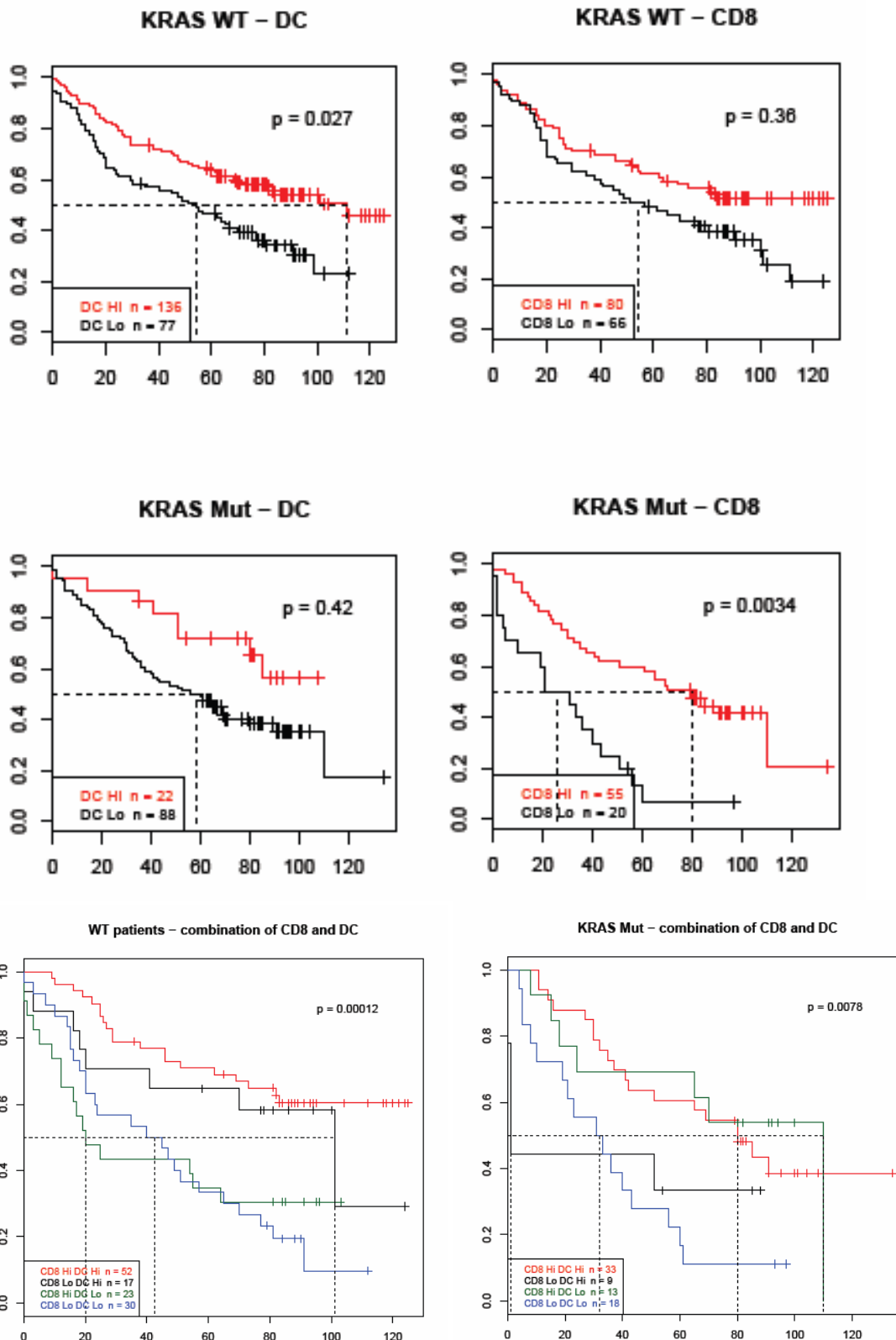


FIGURE 30 : COURBE DE KAPLAN-MEIER DE LA SURVIE GLOBALE DES ADENOCARCINOMES EN FONCTION DU STATUT *KRAS* ET SELON LA DENSITE EN CELLULES DENDRIQUES MATURES ET LA DENSITE EN CELLULES CD8+ (LOG-RANK TEST)

KRAS Mut : tumeurs *KRAS* mutés, *KRAS* WT : tumeurs *KRAS* et *EGFR* sauvages, DC : cellules dendritiques matures, Hi : élevé, Lo : bas, OS : survie globale. Les deux dernières courbes sont une analyse combinée des densités en CD et en cellules CD8+

Discussion

Notre hypothèse de travail était que la nature de l'environnement immunitaire des tumeurs et son impact pronostique étaient directement liés aux caractéristiques des cellules tumorales. En effet, si la complexité du microenvironnement immunitaire des tumeurs est suggérée par de nombreux travaux, son interaction avec les cellules tumorales est encore mal connue. En combinant une analyse morphologique et moléculaire des tumeurs à une quantification des cellules dendritiques matures (CD) et des lymphocytes CD8+, nous avons mis en évidence une variation de la densité et de l'impact pronostique de ces cellules immunitaires selon le statut moléculaire des tumeurs pulmonaires. Dans la population totale des adénocarcinomes pulmonaires, les infiltrats en CD et en cellules CD8+ avaient une valeur pronostique. La combinaison de ces deux populations immunitaires permettait d'identifier les patients ayant une évolution favorable (DC-Lamp élevé/ CD8+ élevé) et ceux ayant un taux de mortalité important (DC-Lamp bas/ CD8+ bas). La stratification des tumeurs selon leur statut mutationnel *KRAS* et *EGFR*, permettait d'identifier une différence de densité des CD, les tumeurs *EGFR* mutées étaient significativement plus riches en CD que les tumeurs WT et les tumeurs *KRAS* mutées étaient significativement moins riches en CD que les tumeurs WT.

Aucune caractéristique morphologique des adénocarcinomes n'était associée à une variation de la densité des CD et des cellules CD8+. Cependant, notre équipe avait démontré, dans une cohorte de 376 CBPNPC de tous stades, que la densité des CD variait selon le type histologique des carcinomes pulmonaires non à petites cellules. En effet, il y avait peu de tumeurs riches en CD dans les carcinomes épidermoïdes ($p=0,02$) (Goc et al., 2014). Les tumeurs de stade évolué étaient significativement moins infiltrées en CD que les tumeurs de stade précoce ($p=0,01$), ce qui pourrait traduire l'inefficacité du système immunitaire pour contrôler la tumeur dans les stades tardifs. Mais cela pourrait également traduire le recrutement par les cellules tumorales d'un environnement immunitaire moins favorable, aboutissant à une tumeur de stade plus avancé.

Par ailleurs, l'impact pronostique des CD et des cellules CD8+ variait selon le statut mutationnel des tumeurs. Dans la population totale des adénocarcinomes, les densités de CD ($p=0,004$) et de cellules CD8+ ($p=0,02$) étaient pronostiques. Dans les tumeurs *KRAS* mutées, la densité en CD n'était pas associée à une valeur pronostique alors que l'infiltrat en cellules CD8+ devenait un important marqueur pronostique ($p=0,003$). Cependant, cette hétérogénéité du microenvironnement immunitaire ne dépend probablement pas que des caractéristiques tumorales mais également des caractéristiques du patient et en particulier de son mode de vie,

comme le suggère la variation de densité des cellules CD8+ et des CD en fonction du statut tabagique.

Notre équipe et d'autres avaient démontré que l'impact pronostique de certaines cellules immunitaires variait également en fonction de l'origine tumorale. En effet, la présence de cellules CD8+ et de cellules dendritiques matures (CD) était associée à un bon pronostic dans les cancers du côlon alors que ces mêmes cellules étaient associées à un mauvais pronostic dans les cancers du rein (Remark et al., 2013, Bromwich et al., 2003, Kolbeck et al., 1992, Hotta et al., 2011, Nakano et al., 2001). En revanche, les données sur les tumeurs métastatiques montraient que pour un même patient, la composition de l'environnement immunitaire de la tumeur primitive était reproduite au niveau des localisations métastatiques (Remark et al., 2013). L'ensemble de ces résultats suggèrent que les lymphocytes T CD8+ ont une fonction qui dépend probablement des autres cellules de l'environnement. Notamment la composition des structures lymphoïdes tertiaires associées aux tumeurs, semble jouer un rôle majeur dans le recrutement et la fonctionnalité de cellules cytotoxiques comme cela a été suggéré dans les tumeurs primitives du rein (Remark et al., 2013).

Conclusion

Nous avons démontré dans cette étude concernant des adénocarcinomes pulmonaires opérés de tous stades que : (1) les données morphologiques (grade histologique des adénocarcinomes et stade TNM) ainsi que l'infiltrat intra-tumoral de lymphocytes T CD8+ et de cellules dendritiques matures sont des facteurs pronostiques indépendants ; (2) les densités en cellules dendritiques et cellules CD8+ varient en fonction du statut mutationnel de ces tumeurs ; (3) l'impact pronostique de ces populations immunitaires varie selon le statut mutationnel. Ces données renforcent l'hypothèse d'une interaction complexe entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires. Une caractérisation moléculaire plus précise des tumeurs par une technologie de séquençage haut débit permettrait de déterminer les anomalies moléculaires les plus associées à l'environnement immunitaire. L'analyse de modèles murins porteurs de mutations nous permettrait de vérifier les particularités de l'infiltrat immunitaire et de l'immunogénicité des tumeurs en fonction des mutations. Nos résultats doivent être complétés par la caractérisation des autres cellules intervenant dans la réponse immunitaire anti-tumorale. En effet, le rôle complexe des lymphocytes T CD8+ dans notre étude pourrait correspondre à une variation de l'ensemble des cellules immunitaires. Nos travaux renforcent l'hypothèse d'une modulation de la réponse immunitaire selon les caractéristiques des cellules tumorales et justifient la mise en place d'analyses personnalisées des tumeurs.

PARTIE IV : Valeur pronostique de la réponse pathologique et du microenvironnement immunitaire intra-tumoral chez les patients atteints d'un cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules, traités par chimiothérapie néoadjuvante

Introduction

Nous avons démontré que la densité de l'infiltrat immunitaire intratumoral, représenté par l'infiltrat en cellules CD8+ et en cellules dendritiques matures (CD) était associée au pronostic des patients opérés pour un carcinome pulmonaire non à petites cellules sans traitement néoadjuvant (Dieu-Nosjean *et al.*, 2008; Goc *et al.*, 2014; partie III de cette thèse). La chimiothérapie néoadjuvante est le traitement standard des tumeurs localement avancées surtout dans les stades III-N2 (Scagliotti *et al.*, 2012). Après chimiothérapie néoadjuvante, la réponse scannographique selon les critères RECIST (response evaluation criteria in solid tumors), sur la tumeur primitive (T) et sur les métastases ganglionnaires (N) (Park *et al.*, 2003) permet de sélectionner les patients qui pourront bénéficier d'une exérèse chirurgicale de leur tumeur. D'après ces critères, on parle de réponse complète (RC) lorsqu'il n'existe plus de lésions identifiables et que les ganglions lymphatiques mesurent < 10 mm ; de réponse partielle (RP) lorsqu'il existe une diminution d'au moins 30 % de la somme des diamètres des lésions par rapport à la somme des diamètres des lésions initiales avant chimiothérapie ; de progression (PD) lorsqu'il y a une augmentation de ≥ 20 % de la somme des diamètres des lésions, ou lorsqu'une ou plusieurs lésions sont apparues ; et enfin de stabilisation pour les réponses ni RP ni PD. La réponse radiologique semble être associée à une valeur pronostique car les patients présentant une réponse partielle ou complète ont un meilleur pronostic en terme de survie que les patients présentant une maladie stable ou progressive (Therasse *et al.*, 2000).

La réponse pathologique, évaluée sur la pièce d'exérèse chirurgicale après chimiothérapie néoadjuvante, est définie par le pourcentage de cellules tumorales viables. La réponse pathologique comme la réponse radiologique est un marqueur pronostique en terme de survie globale car les patients ayant < 10% de cellules tumorales viables résiduelles ont une survie statistiquement plus longue que les patients présentant une tumeur avec > 10% de cellules tumorales viables après traitement (Pataer *et al.*, 2012 ; Stefani *et al.*, 2010; Garrido *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2002). Cependant, pour les patients peu répondeurs, la réponse

pathologique n'est pas satisfaisante pour prédire la survie à long terme (Martin *et al.*, 2002). Cette donnée souligne la nécessité d'identifier d'autres marqueurs pronostiques permettant de guider la prise en charge thérapeutique de ces patients.

Le microenvironnement immunitaire est connu pour être un facteur pronostique puissant dans de nombreuses tumeurs solides (Galon *et al.*, 2006 ; Fridman *et al.*, 2012; Mlecnik *et al.*, 2011; Pagès *et al.*, 2009; Ladányi *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2007 ; Mahmoud *et al.*, 2011) et en particulier dans les CBPNPC non traités par chimiothérapie néoadjuvante (Dieu-Nosjean *et al.*, 2008; Al-Shibli *et al.*, 2008; Goc *et al.*, 2014). Il est possible que cet infiltrat immunitaire ait également une valeur pronostique dans les tumeurs après chimiothérapie néoadjuvante. Cependant, les effets de la chimiothérapie sur le microenvironnement tumoral ne sont pas bien connus et il a été démontré que la chimiothérapie pouvait modifier la composition et la fonction de l'infiltrat immunitaire (Zitvogel *et al.*, 2008; Zitvogel *et al.*, 2008 ; Turtle *et al.*, 2009 ; Tsuchikawa *et al.*, 2012 ; Ruffell *et al.*, 2012 ; Allan *et al.*, 2004; White *et al.*, 1998 ; Hornychova *et al.*, 2008; Mullins *et al.*, 1999; Tsuda *et al.*, 2007; Apetoh *et al.*, 2007; Ghiringhelli *et al.*, 2004).

L'objectif de ce travail a donc été dans un premier temps de comparer l'infiltrat immunitaire de tumeurs pulmonaires provenant de patients traités et non traités par chimiothérapie néoadjuvante pour étudier l'impact de la chimiothérapie sur l'infiltrat immunitaire. Puis, dans un deuxième temps, d'étudier et de comparer les valeurs pronostiques de la densité de l'infiltrat immunitaire et de la réponse pathologique des tumeurs après chimiothérapie néoadjuvante.

Patients et méthodes

Patients et tumeurs :

Nous avons analysé une cohorte rétrospective de 122 tumeurs pulmonaires de stade III-N2 provenant de patients traités par chimiothérapie néoadjuvante puis opérés dans le service de chirurgie thoracique de l'Hôtel Dieu pendant la période 2001-2008. Avant la chimiothérapie, le diagnostic avait été obtenu par médiastinoscopie ou médiastinotomie (n=61) ou basé sur la présence de ganglion mesurant plus de 2 cm et hypermétabolique au PET scanner (SUV max ≥ 4.5 ; n=61). Trois patients ont reçu une radiothérapie néoadjuvante. La chirurgie a été réalisée uniquement chez les patients ayant une réponse à la chimiothérapie évaluée par les critères RECIST. Après la chirurgie, la plupart des patients (76%) ont reçu un traitement adjuvant par chimiothérapie seule : 34% ou radiothérapie seule : 39% ou les 2 : 27%. Les caractéristiques de ces patients sont décrites dans le Tableau 23. Ces 122 patients ont été comparés à une cohorte de 39 patients de même stade (stade III-N2), opérés entre 2001 et 2002 à l'Hôtel-Dieu et non traités par chimiothérapie néoadjuvante pour les raisons suivantes : preuve histologique de ganglions N2 sur la pièce opératoire non suspectée avant la chirurgie, comorbidités empêchant la chimiothérapie d'induction, ou refus par le patient de la chimiothérapie néoadjuvante (Tableau 24). Cette étude a été réalisée avec l'accord du comité d'éthique d'Ile de France (2008-133 and 2012 06-12).

Analyse histologique :

La totalité des lames tumorales de chaque patient provenant de blocs inclus en paraffine (1 à 20 blocs par patient) ont été relues de manière indépendante par deux pathologistes (Pr D. Damotte et moi-même) dans le but de déterminer la réponse pathologique à la chimiothérapie par analyse semi-quantitative. L'évaluation de la réponse pathologique a été réalisée à partir des lames HES correspondant à la totalité des blocs tumoraux. Les surfaces de tumeur viable, de nécrose et de fibrose sont rapportées en pourcentage par rapport à la surface totale de la lésion. La somme de ces 3 pourcentages (taux de cellules tumorales viables, de nécrose et de fibrose) est égale à 100. Dans les cas où les cellules tumorales étaient peu nombreuses, une étude immunohistochimique (anticorps anti-pancytokératine) a été réalisée. En fonction du taux de cellules tumorales viables, nous avons formé trois groupes : réponse complète (0% de cellules tumorales viables), réponse majeur (1 à 10% de cellules tumorales viables) et réponse partielle ou absence de réponse (>10% de cellules tumorales viables).

Caractéristiques	Nombre (%)	DSS	DFS	OS	
		p value	p value	p value	5 ans (%)
Sexe					
Homme	99 (81%)	0.38	0.30	0.27	27.9
Femme	23 (19%)				42.4
Age (années)		1	0.64	0.26	
≤58					30.9
>58					32.0
Tabagisme		0.65	0.70	0.54	
non	17 (14%)				29.6
oui	105 (86%)				32.3
FEV1 (%)		0.26	0.27	0.17	
[Médiane]	83 [71.2-96.7]				
≤83	64 (52%)				22.2
>83	58 (48%)				40.8
Performance status		0.37	0.79	0.62	
0-1	92 (75%)				31.58
2-3	30 (25%)				29.18
Comorbidité		0.72	0.89	0.99	
Non	22 (18%)				27.8
Oui	100 (82%)				32.2
Modéré	79				
Sévère	21				
Côté de la tumeur		0.57	0.64	0.56	
Gauche	40 (33%)				36.4
Droit	82 (67%)				28.2
Taille tumeur (mm; imagerie)		0.26	0.37	0.21	
[Médiane]	50 [40-60]				
≤50	71 (58%)				15.8
>50	51 (42%)				37.8
Stade TNM avant la chimiothérapie		0.61	0.51	0.86	
IIIA	111 (91%)				32
IIIB	11 (9%)				20.2
Nombres de cycles		0.12	0.06	0.004	
≤2	53 (44%)				19.5
>2	69 (56%)				41.1

Caractéristiques	Nombre (%)	DSS	DFS	OS	
		P value*	P value*	P value*	5 ans (%)
Réponse clinique sur la tumeur		0.0003	0.0001	0.0005	
Maladie stable	45 (37%)				13.5
Réponse objective	77 (63%)				39.9
Réponse clinique ganglionnaire		0.00003	0.002	0.0009	
Maladie stable	44 (36%)				14.8
Réponse objective	78 (64%)				39.7
Réponse clinique (T+N)		0.0002	0.003	0.0006	
oui	88 (72%)				38.4
non	34 (28%)				11.3
Type intervention		0.051	0.2	0.02	
Lobectomies	54 (44%)				42.7
Bilobectomies	12 (10%)				NA
Pneumonectomies	56 (46%)				23.5
Qualité de la résection		0.1	0.07	0.06	
R0	114 (93%)				32.2
R1-2	8 (7%)				NA
Type histologique		0.1	0.03	0.047	
Adénocarcinome	51 (42%)				52.2
Carcinome épidermoïde	52 (43%)				24.5
C. à grandes cellules	19 (15%)				14.7
Réponse objective pathologique (tumeur)		0.01	0.03	0.002	
oui	32 (26%)				52.2
non	90 (74%)				24.5
Réponse objective pathologique (ganglion)		0.005	0.02	0.004	
oui (pN0-N1)	51 (42%)				41.4
non (pN2)	71 (58%)				23.6

TABLEAU 23 : CARACTERISTIQUES DES 122 PATIENTS PORTEURS D'UN CARCINOME NON A PETITES CELLULES DE STADE III-N2 TRAITES PAR CHIMIOOTHERAPIE NEOADJUVANTE
OS: overall survival (survie globale), DSS: disease specific survival (survie spécifique), DFS: disease free survival (survie sans récurrence), NA: non atteint. R0 : résection complète, R1-2 : résection incomplète

Caractéristiques	Nombre (%)
Sexe : Homme/ Femme	31 (79%)/8 (21%)
Age (années) : moyenne (extrêmes)	64.5 (44-82)
Tabagisme Oui/ Non	33 (84%)/3 (8%)
BPCO Oui/ Non	17 (44%)/22 (56%)
Côté Gauche/ Droit	18 (46%)/21 (54%)
Type de résection :	
Lobectomie/Bilobectomie/Pneumectomie	22 (56%)/4 (10%)/13 (34%)
Type histologiques :	
Adénocarcinome	22(56%)/
Carcinome épidermoïde	14(36%)/
Carcinome à grandes cellules	2(5%)/
Autres	1(3%)
Stade TNM : IIIA/IIIB	38 (97%)/1 (3%)
Statut vital : Vivant/Décédé/Non renseigné	12 (31%)/23 (59%)/4 (10%)

TABLEAU 24 : CARACTERISTIQUES DES 39 PATIENTS PORTEURS D'UN CARCINOME NON A PETITES CELLULES DE STADE III-N2 NON TRAITES PAR CHIMIOOTHERAPIE NEOADJUVANTE
 Les caractéristiques cliniques de ces patients sont relativement similaires à celles des patients traités par chimiothérapie néoadjuvante.

Analyse immunohistochimique :

Pour chaque tumeur, le bloc de tissu pulmonaire tumoral fixé et inclus en paraffine, correspondant à la zone la plus infiltrée par des lymphocytes, a été sélectionné puis des lames blanches ont été réalisées pour effectuer l'analyse immunohistochimique. Le marquage a été effectué avec les anticorps primaires suivants : CD3 (clone A0452, Dako), CD8 (clone SP16, Springbioscience), CD20 (clone L26, Dako), DC-Lamp (clone 1010E1.01, Dendritics), comme précédemment décrit dans la partie III. La quantification des cellules dendritiques matures DC-LAMP+ et des lymphocytes T CD8+ a été effectuée comme indiqué précédemment dans la partie III, mais toutes les quantifications ont été réalisées manuellement sans l'aide du logiciel de comptage calopix. Le comptage a été réalisé par deux observateurs indépendants et une relecture a été faite pour les cas discordants, jusqu'à l'obtention d'un consensus.

Analyse statistique :

Les courbes de survie globale (OS), spécifique (DSS) et sans récurrence (DFS) ont été estimées suivant la méthode de Kaplan-Meier, et les différences entre les groupes de patients ont été évaluées par le test de Log-rank. La valeur de p a été déterminée grâce à l'utilisation d'un seuil déterminé à partir de la survie des patients, comme décrit précédemment dans la partie III. Le seuil pour les CD8 est de 521 cellules/mm² et pour les DC-LAMP de 1,9 cellules/mm². Les paramètres significatifs identifiés à l'analyse univariée ont été utilisés pour l'analyse multivariée à l'aide d'un modèle de Cox. Des courbes de ROC ont été utilisées pour évaluer la performance pronostique de l'infiltrat immunitaire, du stade ypTNM et du pourcentage de cellules tumorales viables. Les tests de Mann-Whitney et Kruskal-Wallis ont été utilisés pour comparer la densité de l'infiltrat immunitaire entre les différents groupes de patients. Un p<0.05 a été considéré comme statistiquement significatif. Toutes les analyses ont été effectuées avec les logiciels Prism 5 (GraphPad), Statview (Abacus Systems) et R (<http://www.r-project.org/>).

Résultats

La réponse clinique après chimiothérapie néoadjuvante prédit la survie.

Sur les 122 patients, 91% étaient classés en stade IIIA et 9% en stage IIIB (T4N2). Soixante-neuf patients sont décédés (moyenne survie globale : 18 mois; 78% sont décédés de leur cancer), 53 patients ont survécu avec une moyenne de suivi de 42 mois. La réponse clinique globale, la réponse clinique tumorale et la réponse clinique ganglionnaire sont associées à une meilleure survie globale (p=0.0006, p=0.0005 et p=0.0009), survie sans maladie (p=0.003, p=0.0001 et p=0.002) et survie spécifique (p=0.0002, p=0.0003 et p=0.00003) (Tableau 23).

La réponse pathologique après chimiothérapie néoadjuvante prédit la survie.

La chimiothérapie néoadjuvante entraîne des modifications histologiques liées à la régression tumorale, déjà bien décrites par d'autres équipes (Pataer *et al.*, 2012; Junker *et al.*, 2001; Yamane *et al.*, 2010 ; Mouillet *et al.*, 2012; Liu-Jarin *et al.*, 2003). Les modifications histologiques sont essentiellement représentées par la fibrose et la nécrose tumorale (Figure 30). Ces aspects sont hétérogènes et diffèrent entre chaque patient.

La réponse pathologique est définie par le pourcentage de cellules tumorales viables (Figure 31). Dans notre étude, 15 patients (12%) avaient une réponse complète (pas de cellules tumorales viables), 12 patients (10%) avaient une réponse majeure (entre 1 à 10% de cellules tumorales), et 95 patients (78%) avaient une réponse partielle (> 10% de cellules tumorales).

Les 27 patients qui avaient une réponse pathologique complète ou majeure (<10% de cellules tumorales viables) avaient une meilleure survie globale, spécifique et sans récurrence ($p=0,01$, $0,02$ et $0,05$ respectivement) que les patients avec plus de 10% de cellules tumorales viables (Figure 32). Les patients avec 1 à 10% de cellules tumorales viables après traitement avaient également un meilleur pronostic que les patients avec plus de 10% de cellules tumorales viables après traitement ($p=0,04$). Les pourcentages de nécrose et de fibrose n'étaient pas significativement associés à la survie des patients.

Puisque le groupe des patients ayant <10% de cellule tumorale résiduelle après traitement est composé des patients avec réponse complète et des patients avec réponse majeure, nous avons analysé ces 2 groupes séparément. Pendant les 2 premières années qui suivent l'intervention chirurgicale, les patients avec réponse complète ont une meilleure survie que les patients avec réponse majeure ($p=0,0095$). Mais à plus long terme, cette valeur n'est plus significative ($p=0,13$) et les patients avec 1 à 10% de cellules tumorales viables tendent même à avoir un meilleur pronostic que les patients sans cellule tumorale résiduelle (Figure 33), sans que les caractéristiques cliniques de ces patients ne puissent expliquer ou interférer avec ces résultats.

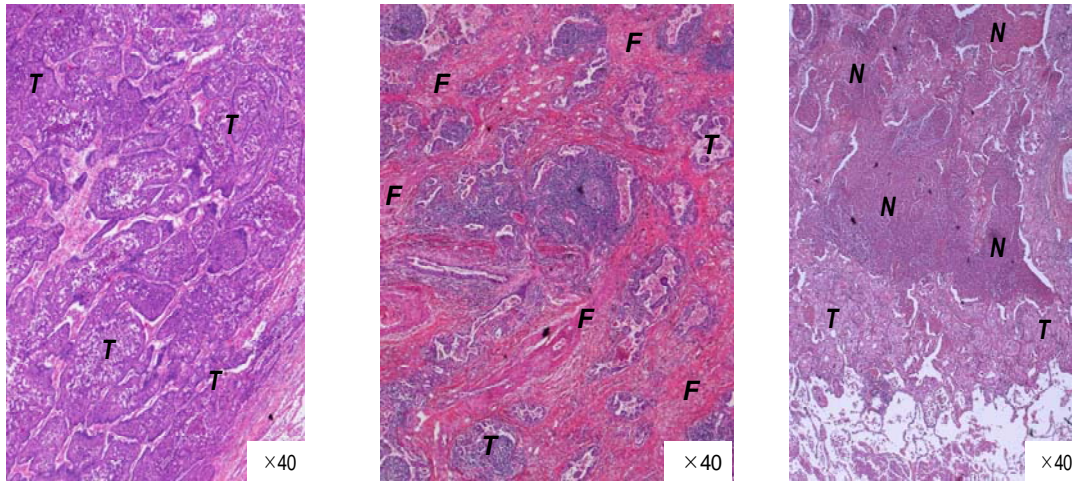


FIGURE 31 : ASPECT HISTOLOGIQUE DE TUMEURS PULMONAIRES CHEZ DES PATIENTS TRAITES PAR CHIMIOThERAPIE NEOADJUVANTE.
 Coloration HES, grossissement x 400, T : tumeur viable, F : fibrose, N : nécrose.

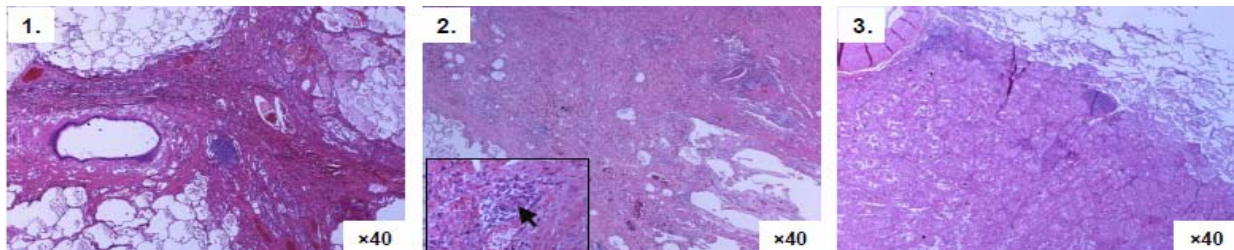


FIGURE 32 : ASPECT HISTOLOGIQUE REPRESENTATIF DES 3 TYPES DE REPONSES PATHOLOGIQUES APRES CHIMIOThERAPIE NEOADJUVANTE
 Coloration HES, grossissement x 400. (1) réponse complète : 0% de cellules tumorales viables, (2) réponse majeure : 1-10% de cellules tumorales viables et (3) réponse partielle : >10% de cellules tumorales viables.

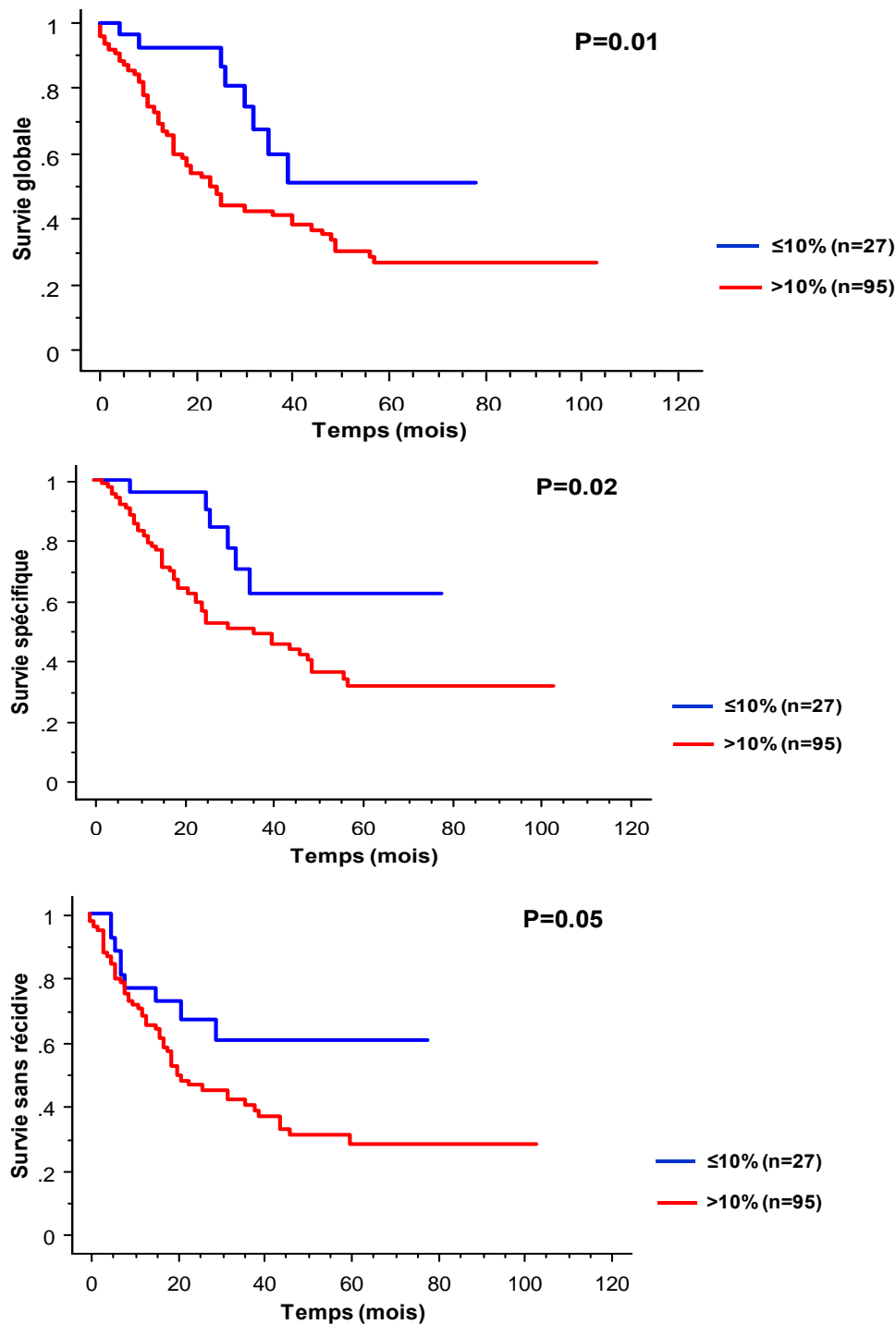


FIGURE 33 : COURBES DE KAPLAN-MEIER DE LA SURVIE GLOBALE, SURVIE SPECIFIQUE ET SURVIE SANS RECIDIVE EN FONCTION DU POURCENTAGE DE CELLULES TUMORALES VIABLES RESIDUELLES

Les courbes rouges représentent les patients avec réponse partielle (>10% de cellules tumorales résiduelles) et les courbes bleues correspondent aux patients avec réponse majeure ou complète ($\leq 10\%$ de cellules tumorales résiduelles).

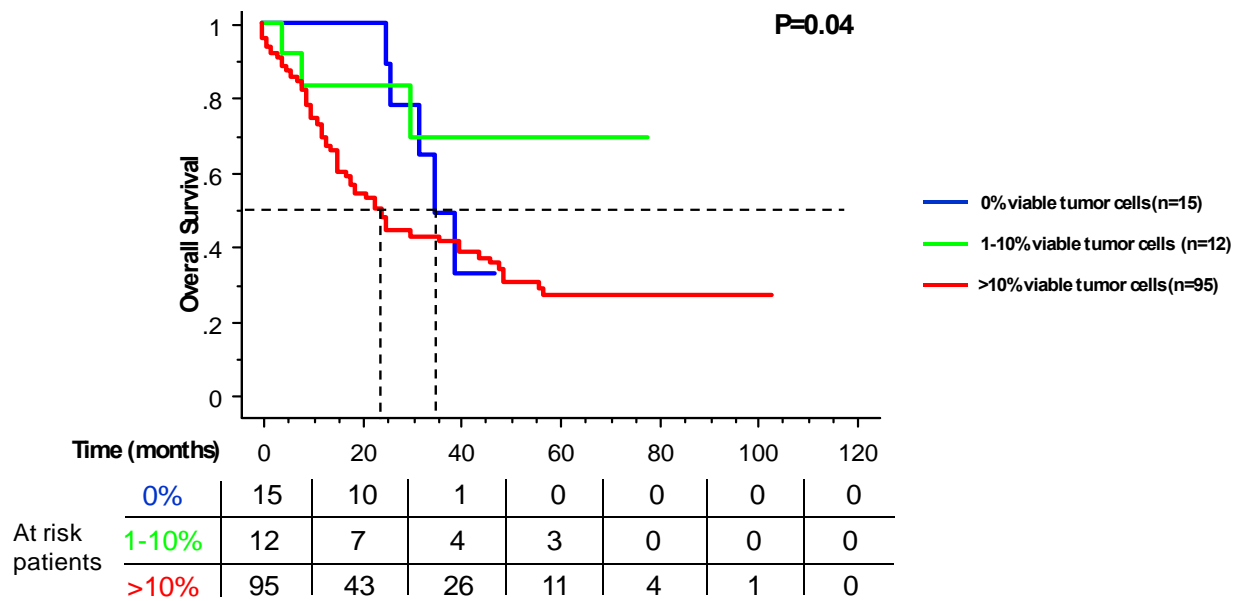


FIGURE 34 : COURBE DE KAPLAN-MEIER DE LA SURVIE GLOBALE EN FONCTION DU POURCENTAGE DE CELLULES TUMORALES VIABLES

La courbe rouge représente les patients avec réponse partielle (>10% de cellules tumorales résiduelles), la courbe verte correspond aux patients avec réponse majeure (1-10% de cellules tumorales résiduelles), la courbe bleue correspond aux patients avec réponse complète.

Le microenvironnement immunitaire présent dans les tumeurs après chimiothérapie néoadjuvante prédit la survie des patients.

Puisqu'il a été rapporté que la chimiothérapie pouvait modifier la densité et les fonctions des cellules immunitaires (Zitvogel *et al.*, 2008; Zitvogel *et al.*, 2008 ; Turtle *et al.*, 2009; Ruffell *et al.*, 2012 ; White *et al.*, 1998 ; Hornychova *et al.*, 2008; Mullins *et al.*, 1999 ; Tsuda *et al.*, 2007; Apetoh *et al.*, 2007; Ghiringhelli *et al.*, 2004), nous avons étudié l'effet de la chimiothérapie sur l'infiltrat immunitaire intra-tumoral. Quel que soit le type de chimiothérapie, nous avons retrouvé des structures lymphoïdes tertiaires dans les tumeurs après chimiothérapie néoadjuvante, comme cela avait déjà été démontré dans les tumeurs non traitées par chimiothérapie adjuvante (Figure 34) (Dieu-Nosjean *et al.*, 2008 ; Goc *et al.*, 2014). De plus, les densités en LT CD8+ et en CD DC-LAMP+ ne sont pas significativement différentes entre les patients traités et les patients non traités par chimiothérapie néoadjuvante (Figure 35). Il n'a pas été retrouvé de différence sur la densité des populations immunitaires étudiées en fonction des drogues, du nombre de cycles ou du délai entre la chirurgie et la chimiothérapie.

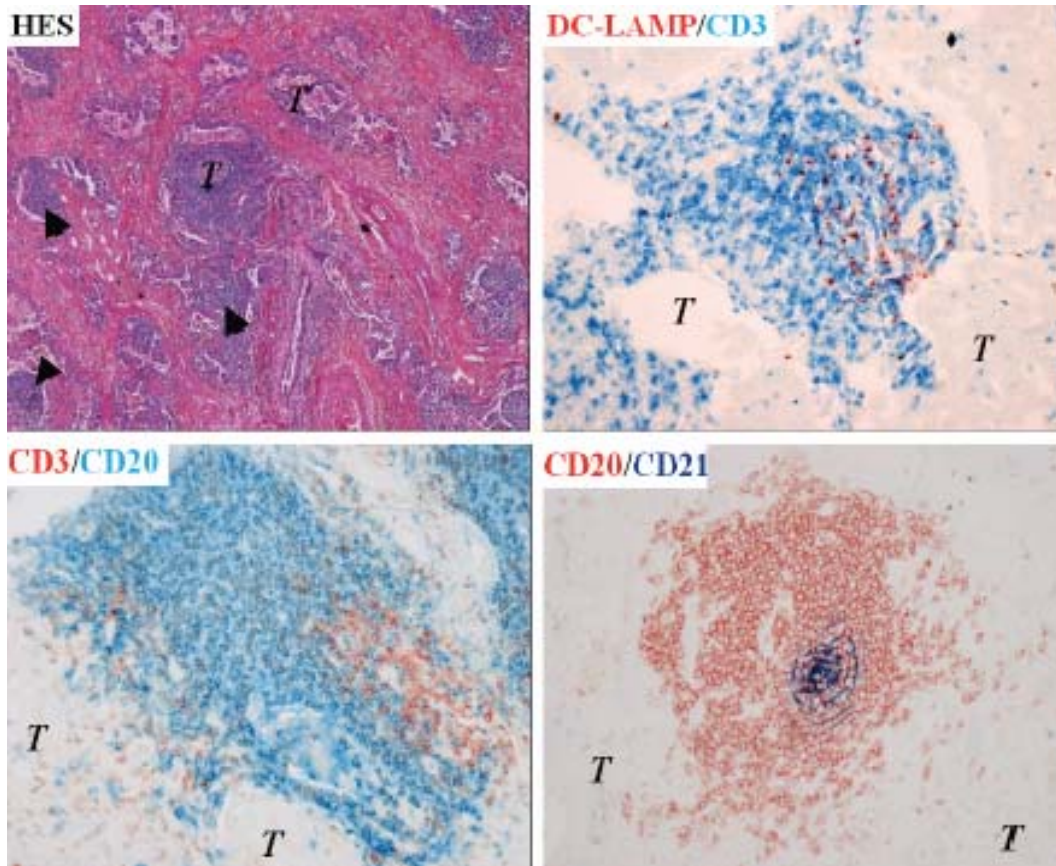


FIGURE 35 : COUPES HES ET IMMUNOHISTOCHIMIQUES DE STRUCTURES LYMPHOÏDES TERTIAIRES DANS DES TUMEURS TRAITÉES PAR CHIMIOTHÉRAPIE NEOADJUVANTE

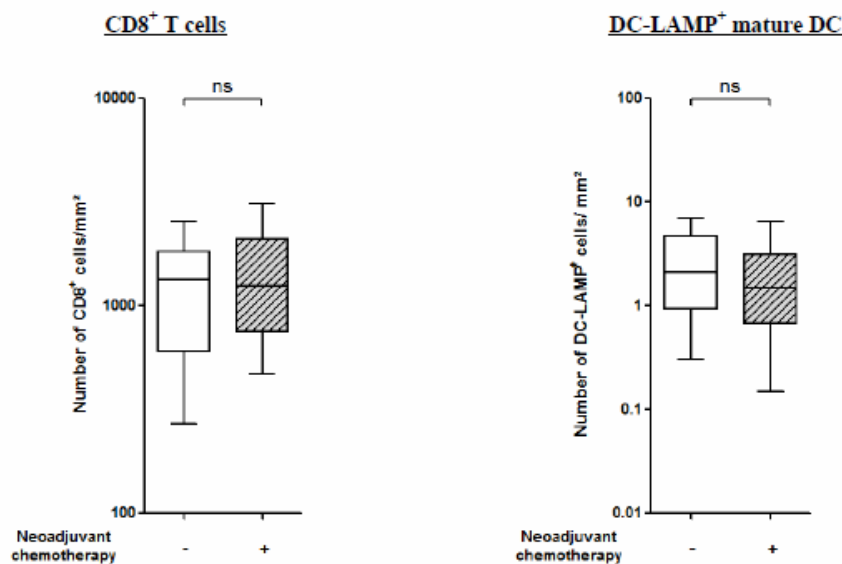


FIGURE 36 : ANALYSE DE LA DENSITÉ DES LT CD8⁺ ET DES CELLULES DENDRITIQUES MATURES EN FONCTION DU TRAITEMENT OU NON PAR CHIMIOTHÉRAPIE NEOADJUVANTE.

Nous avons ensuite comparé la densité en cellules immunitaires en fonction du pourcentage de cellules tumorales viables. La densité en LT CD8⁺ n'était pas liée au pourcentage de

cellules tumorales résiduelles ($p > 0.05$, Figure 36). En revanche, si l'on compare la densité des CD matures et la réponse pathologique, on remarque que chez les 15 patients qui présentaient une réponse complète (0% de cellules tumorales), la densité des CD matures infiltrant la lésion résiduelle était très faible, alors que chez les patients avec plus de 0% de cellules tumorales viables, la densité de CD matures était significativement supérieure à celle trouvée chez les patients sans aucune cellule tumorale résiduelle ($p < 0.0001$, Figure 36).

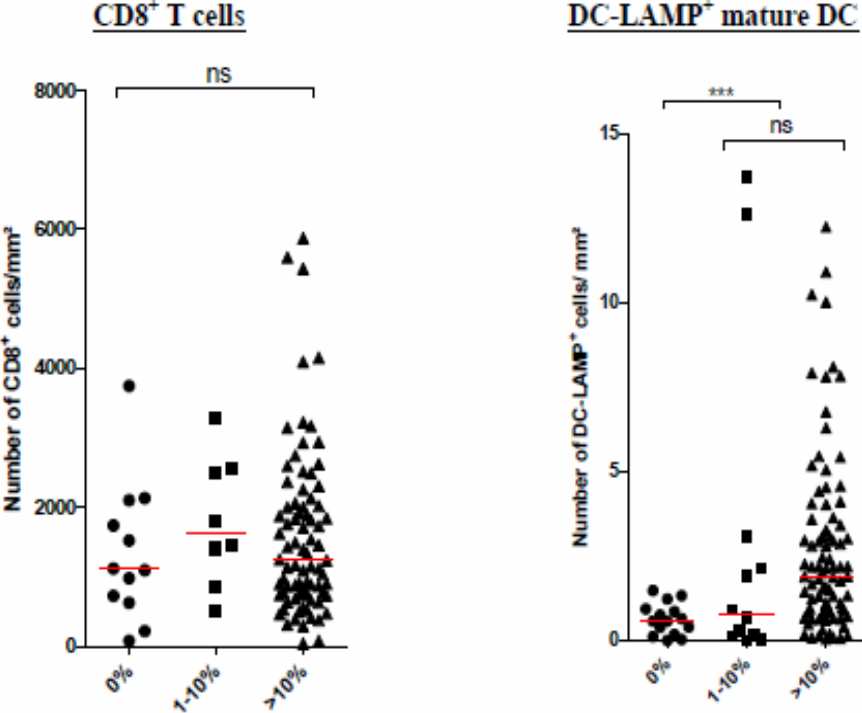
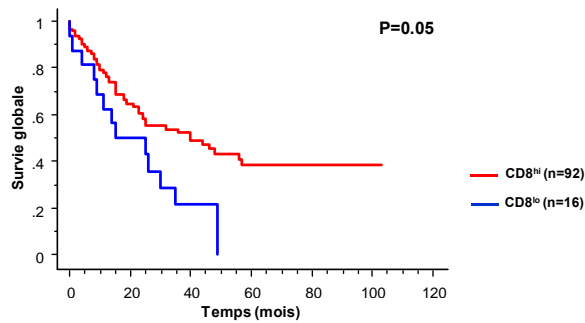


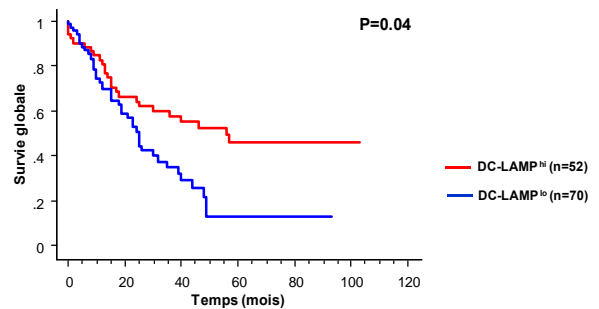
FIGURE 37 : DENSITES DES CELLULES DENDRITIQUES MATURES ET DES LYMPHOCYTES CD8+ SELON LE POURCENTAGE DE CELLULES TUMORALES VIABLES

Puis, nous avons déterminé la valeur pronostique des densités de l'infiltrat en cellules CD8⁺ et en cellules DC-LAMP⁺. Nous avons confirmé que les tumeurs, traitées par chimiothérapie néoadjuvante, fortement infiltrées par des LT CD8⁺ et des CD DC-LAMP⁺ étaient associées à une meilleure survie globale, survie sans récurrence et survie spécifique (Figure 37). La médiane de la survie globale était respectivement, de 16 et 41 mois pour les patients avec une faible et une forte densité en CD8⁺, et 25 et 56 mois pour les tumeurs faiblement et fortement infiltrées en CD (DC-LAMP⁺).

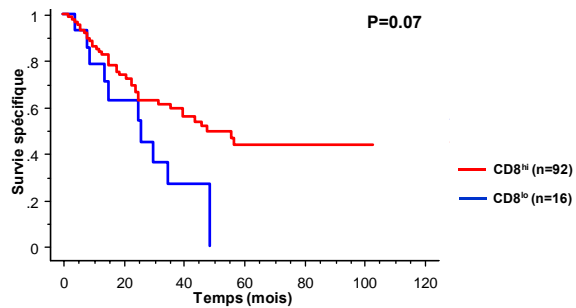
a. Survie globale-CD8⁺ :



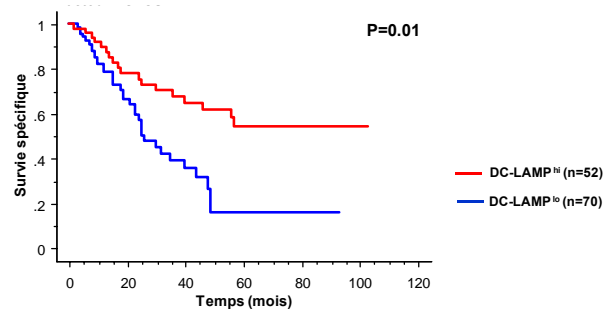
b. Survie globale-DC-LAMP⁺ :



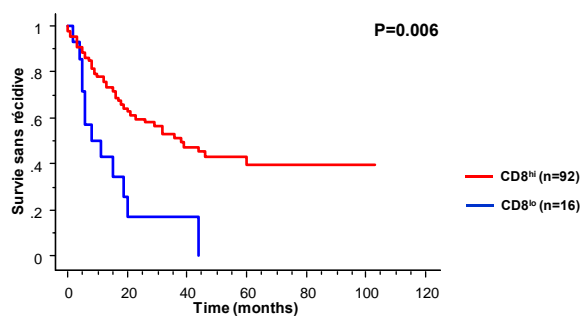
c. Survie spécifique-CD8⁺ :



d. Survie spécifique-DC-LAMP⁺ :



e. Survie sans récurrence-CD8⁺ :



f. Survie sans récurrence-DC-LAMP⁺ :

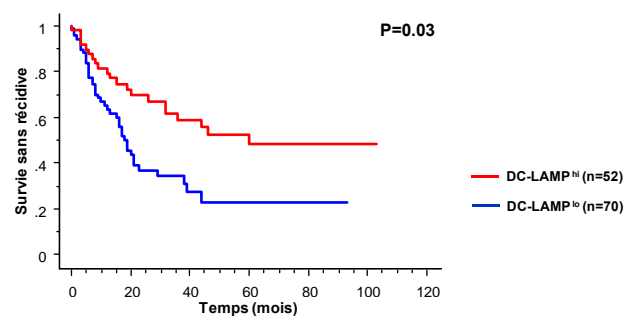


FIGURE 38 : COURBES DE KAPLAN-MEIER DE LA SURVIE GLOBALE, SPECIFIQUE ET SANS RECURRENCE SELON LA DENSITE DES LT CD8⁺ ET DES CD MATURES DC-LAMP⁺.
Valeurs de cutoff: CD8⁺ : 521 cellules/mm² ; DC-LAMP⁺ : 1,9 cellules/mm².

L'index immunitaire est un facteur pronostique indépendant.

L'index immunitaire obtenu en combinant les marqueurs CD8 et DC-LAMP permet de discriminer les patients de bon pronostic (tumeur fortement infiltrée en lymphocytes CD8+ et en CD DC-LAMP+) et de mauvais pronostic (tumeur faiblement infiltrée en lymphocytes CD8+ et en CD DC-LAMP+) ($p=0,02$; $0,002$ et $0,001$, respectivement pour la survie globale (OS), spécifique (DSS) et sans récurrence (DFS)) (Figure 39).

En analyse univariée, le type d'intervention, la qualité de la résection, le nombre de cycles, le pourcentage de cellules tumorales viables, le stade pathologique après chimiothérapie (ypTNM) et l'index immunitaire sont associés de manière significative à la survie globale (Tableau 25).

En analyse multivariée, l'index immunitaire, la réponse clinique, le stade pathologique et le pourcentage de cellules tumorales viables sont des facteurs prédictifs de l'OS, la DFS et la DSS (Tableau 26). L'index immunitaire est le marqueur pronostique le plus sensible et le plus spécifique en comparaison du stade ypTNM et du pourcentage de cellules tumorales viables (aires sous la courbe de $0,65$; $0,60$ et $0,58$ respectivement).

	Variable	Risque relatif	IC 95%	Valeur de p
Paramètres cliniques	Sexe	0.75	0.39 à 1.43	0.4
	Age	1.45	0.74 à 2.84	0.2
	Statut tabagique	0.83	0.43 à 1.58	0.5
	BPCO	0.42	0.75 à 1.97	0.4
	Côté	1.17	0.69 à 1.96	0.5
	Type d'intervention	1.38	1.07 à 1.78	0.01
	Qualité de la résection	2.65	1.33 à 5.29	0.006
	Type histologique	0.90	0.79 à 1.02	0.1
	Agent de chimiothérapie	0.92	0.71 à 1.20	0.5
	Nombre de cycles	0.50	0.31 à 0.81	0.004
	Délai d'attente entre la chimiothérapie et la chirurgie	0.96	0.64 à 1.42	0.8
	% de cellules tumorales viables	1.66	1.05 à 2.63	0.03
	Stade TNM après chimiothérapie	1.53	1.12 à 2.08	0.007
	Paramètres immunitaires	Densité CD8+	0.45	0.25 à 0.83
Densité DC-LAMP+		0.50	0.30 à 0.83	0.007
Densité CD20+		0.41	0.24 à 0.70	0.001
Index Immunitaire (CD8-DC-LAMP)		0.55	0.40 à 0.77	0.0005

TABLEAU 25 : ANALYSE UNIVARIEE DE LA SURVIE GLOBALE EN FONCTION DES PARAMETRES CLINIQUES ET IMMUNITAIRES.

L'index immunitaire est obtenu en combinant les marqueurs CD8 et DC-LAMP.

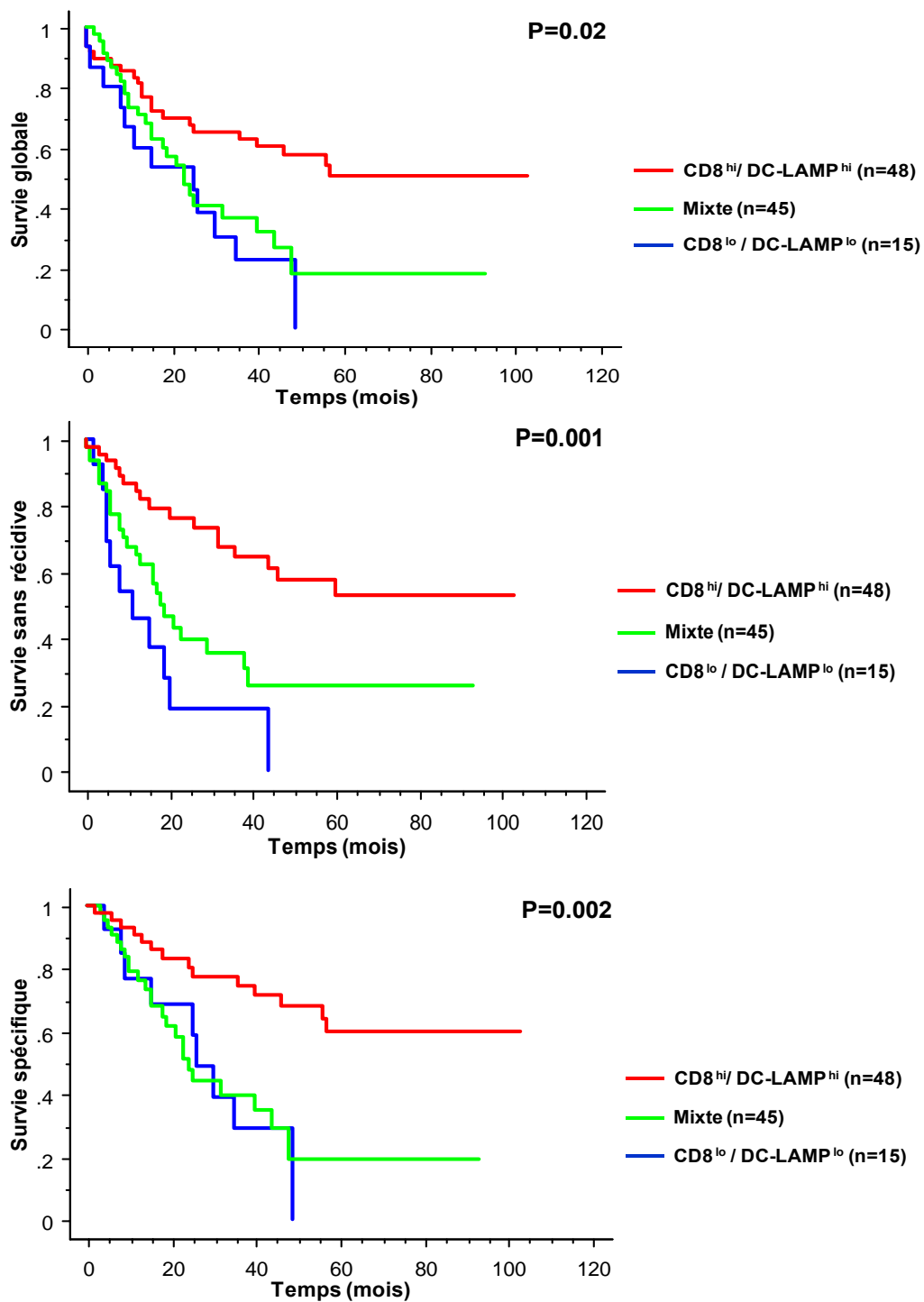


FIGURE 39 : COURBES DE KAPLAN-MEIER DE LA SURVIE GLOBALE, SPECIFIQUE ET SANS RECIDIVE EN FONCTION DE L'INDEX IMMUNITAIRE (ANALYSE COMBINEE DE LA DENSITE DE LT CD8+ ET DES CD MATURES DC-LAMP+).

Les courbes rouges représentent les patients avec de fortes densités (Hi) de cellules CD8+ et DC-LAMP+, les courbes vertes représentent les patients avec une infiltration hétérogène et les courbes bleues les patients avec de faibles densités (Lo) de ces deux populations immunitaires.

Variable	Modèle 1			Modèle 2			Modèle 3			
	HR	95%CI	P-value	HR	95%CI	P-value	HR	95%CI	P-value	
OS	Réponse Clinique globale <i>Non vs oui</i>	1.76	1.05-1.95	0.03	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Réponse pathologique globale <i>Non vs oui</i>	NA	NA	NA	1.93	1.10-3.37	0.02	NA	NA	NA
	Pourcentage de cellules tumorales viables <i>>10% vs ≤10%</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2.87	1.32-6.23	0.007
	Intervention <i>Pneumectomies et bilobectomies vs lobectomies</i>	1.84	1.10-3.08	0.02	1.77	1.06-2.98	0.03	1.58	0.93-2.66	0.088
	Types histologiques <i>Non épi vs épi</i>	1.91	1.15-3.17	0.013	1.95	1.17-3.24	0.011	1.87	1.12-3.13	0.017
	Index mmunitaire <i>Low vs Mix+High</i>			0.001			0.00006			0.00002
	<i>Low+Mix vs High</i>	0.56	0.39-0.79		0.49	0.34-0.69		0.46	0.32-0.66	
DSS	Réponse Clinique globale <i>Non vs oui</i>	1.98	1.08-3.63	0.027	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Réponse pathologique globale <i>Non vs oui</i>	NA	NA	NA	2.17	1.15-4.09	0.017	NA	NA	NA
	Pourcentage de cellules tumorales viables <i>>10% vs ≤10%</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3.25	1.33-7.92	0.0096
	Intervention	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Types histologiques <i>Non épi vs épi</i>	0.80	0.44-1.46	0.46	0.73	0.41-1.3	0.28	0.89	0.48-1.62	0.69
	Index mmunitaire <i>Low vs Mix+High</i>			0.008			0.0008			0.0002
	<i>Low+Mix vs High</i>	0.58	0.39-0.87		0.5	0.34-0.75		0.46	0.30-0.69	
DFS	Réponse Clinique globale <i>Non vs oui</i>	1.87	1.07-3.25	0.027	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Réponse pathologique globale <i>Non vs oui</i>	NA	NA	NA	2.2	1.24-3.90	0.007	NA	NA	NA
	Pourcentage de cellules tumorales viables <i>>10% vs ≤10%</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Intervention	2.24	1.29-3.89	0.04	2.35	1.35-4.08	0.0024	NA	NA	NA
	Types histologiques <i>Non épi vs épi</i>			0.0008			0.000026	NA	NA	NA
		0.53	0.36-0.77		0.46	0.32-0.66				
		0.28	0.13-0.59		0.21	0.10-0.43				
	Index mmunitaire <i>Low vs Mix+High</i>			0.0008			0.000026	NA	NA	NA
<i>Low+Mix vs High</i>	0.53	0.36-0.77		0.46	0.32-0.66					
	0.28	0.13-0.59		0.21	0.10-0.43					

TABEAU 26 : ANALYSE MULTIVARIEE DE LA SURVIE GLOBALE, SPECIFIQUE ET SANS RECIDIVE SELON LES CRITERES CLINIQUES, PATHOLOGIQUES ET IMMUNITAIRES.

Le modèle 1 prend comme référence la réponse clinique complète, le modèle 2 la réponse pathologique et le modèle 3 le pourcentage de cellules tumorales viables. Le stade pathologique n'est pas inclus dans les modèles 2 et 3 car il est fortement corrélé au downstaging ganglionnaire et à la réponse histopathologique. CI: intervalle de confiance; HR: hazard ratio; NA: non applicable. Epi : carcinome épidermoïde, non épi : carcinome non épidermoïde, OS: survie globale, DFS: survie sans maladie, DSS: survie spécifique, low: densité faible, high: densité forte, mix : CD8 low/DChigh ou CD8high/DC low).

Le pourcentage de cellules tumorales viables et l'index immunitaire sont des facteurs pronostiques indépendants et complémentaires.

Puisque la réponse pathologique et l'index immunitaire sont deux marqueurs pronostiques indépendants, nous avons émis l'hypothèse que la combinaison de ces 2 marqueurs pourrait prédire la survie à long terme de ces patients. Nous avons donc analysé différents sous-groupes de patients selon le pourcentage de cellules tumorales viables et selon la densité en lymphocytes T CD8⁺ ou en CD matures DC-LAMP⁺. De manière intéressante, nous avons démontré que le pourcentage de cellules tumorales viables et l'index immunitaire donnent des informations complémentaires sur la survie des patients. Ainsi, pendant les 24 premiers mois suivant la résection chirurgicale, le marqueur pronostic le plus puissant est le pourcentage de cellules tumorales viables ($p < 0,01$), en effet 100% des patients avec 0% de cellules tumorales résiduelles sont encore vivants 2 ans après la chirurgie. Alors que les densités en LT CD8⁺ et en CD DC-LAMP⁺ prédisent la survie à long terme au-delà de 3 ans ($p < 0,05$) (Tableau 27).

Paramètres	Groupes	Temps (mois)			
		T ₁	T ₂		
		24	36	60	96
% cellules tumorales viables	0%	100%	49%	NA	NA
	1-10%	83%	69%	69%	NA
	>10%	48%	41%	27%	27%
CD8 ⁺ -DC-LAMP ⁺ cellules (densité)	Forte	68%	63%	50%	50%
	Faible	53%	23%	0%	0%

TABLEAU 27 : NOMBRE DE PATIENTS SURVIVANTS A 24, 36, 60 ET 96 MOIS EN FONCTION DU POURCENTAGE DE CELLULES TUMORALES VIABLES ET DE L'INDEX IMMUNITAIRE

NA : non atteint

Discussion

Le but de ce travail a été de montrer l'impact pronostique de la réponse pathologique et de l'infiltrat immunitaire chez les patients atteints d'un carcinome non à petites cellules, traités par chimiothérapie néoadjuvante.

Nous avons confirmé que dans les carcinomes non à petites cellules traités par chimiothérapie néoadjuvante de stade III (N2), les réponses clinique et pathologique prédisaient la survie des patients. Trois groupes de patients ont été identifiés selon la réponse pathologique : patients avec réponse complète (0% de cellules tumorales viables), réponse majeure (1-10% de cellules tumorales viables) et réponse partielle (>10% de cellules tumorales viables). Comme cela avait été déjà rapporté par d'autres, la présence de <10% de cellules tumorales viables représentait un marqueur de bon pronostic (William et al., 2013; Pataer et al., 2012; Garrido et al., 2007; Martin et al., 2002; Stefani et al., 2010). Ainsi, la combinaison du pourcentage de cellules tumorales et du stade ganglionnaire (ypTNM) devrait être évaluée pour toutes les tumeurs après chimiothérapie néoadjuvante.

Nous avons trouvé que les patients qui présentaient une tumeur possédant 1 à 10% de cellules tumorales viables avaient une meilleure survie à long terme que les patients qui ne possédaient aucune cellule tumorale résiduelle. Les conclusions sont difficiles à porter compte-tenu du faible nombre de patients mais il semblerait que la faible densité de cellules dendritiques matures (CD) dans le groupe de patient sans cellule tumorale puisse expliquer ce moins bon pronostic. Puisque les CD sont impliquées dans la constitution des structures lymphoïdes tertiaires, ces cellules pourraient jouer un rôle majeur dans la réponse immunitaire anti-tumorale.

Nous avons observé des densités en cellules immunitaires similaires et une organisation en structures lymphoïdes tertiaires chez les patients traités par chimiothérapie néoadjuvante comme c'était le cas chez les patients sans traitement d'induction (Dieu-Nosjean et al., 2008; Goc et al., 2014). Ceci suggère que le délai entre la fin de la chimiothérapie et la chirurgie est suffisant pour restaurer le microenvironnement immunitaire, généralement entre 3 et 6 semaines. Il est malheureusement difficile d'étudier et de comparer l'infiltrat immunitaire présent avant chimiothérapie à celui présent après chimiothérapie pour une même tumeur, car les prélèvements pulmonaires tumoraux avant chimiothérapie sont de trop petite taille (biopsies) pour étudier l'environnement immunitaire ou bien concernent le plus souvent des prélèvements ganglionnaires médiastinaux. De plus, le microenvironnement immunitaire des patients n'ayant pas répondu à la chimiothérapie n'a pas été étudié car ces patients n'ont pas été opérés.

Nous avons démontré qu'une importante densité en LT CD8⁺ et en CD matures était associée à une meilleure survie chez les patients de stade III-N2 comme c'était le cas chez les patients non traités par chimiothérapie d'induction (Goc et al., 2014; Dieu-Nosjean et al., 2008; Al-Shibli et al., 2008). Les patients avec une forte densité en LT CD8⁺ et une faible densité en CD matures DC-LAMP⁺ avaient un mauvais pronostic, similaire à celui des patients avec une faible densité pour ces 2 types cellulaires. Cela suggère que les cellules dendritiques matures, situées dans les structures lymphoïdes tertiaires (SLT) seraient donc importantes pour le contrôle des tumeurs et les lymphocytes T CD8⁺ n'auraient d'activité anti-tumorale efficace qu'en présence des cellules dendritiques matures, qui pourraient par la présentation antigénique, activer les T CD8⁺, à l'intérieur des SLT. Notre étude suggère également que la présence de cellules tumorales viables est nécessaire pour induire cette réponse immunitaire grâce à la présentation antigénique par les cellules dendritiques matures.

Enfin, nous avons démontré que la combinaison de la réponse pathologique et de l'index immunitaire étaient des marqueurs complémentaires pour prédire la survie des patients porteurs d'un carcinome non à petites cellules traités par chimiothérapie néoadjuvante. D'ailleurs, certaines données soulignent le fait que la chimiothérapie induit des effets bénéfiques à court terme alors que l'immunothérapie aurait des effets à long terme (Topalian et al., 2012; Brahmer et al., 2012).

Conclusion

Notre étude a permis de démontrer que dans les carcinomes non à petites cellules traités par chimiothérapie néoadjuvante, la réponse pathologique et l'infiltrat immunitaire prédisaient respectivement, la survie à court terme et à long terme. La combinaison de ces deux marqueurs permettait d'identifier les patients ayant survécu le plus longtemps, c'est-à-dire ceux qui possédaient une forte densité en LT CD8⁺ et en CD DC-LAMP⁺ et une bonne réponse histologique. Ces données soulignent l'intérêt d'utiliser de tels marqueurs comme marqueurs pronostiques chez les patients atteints d'un carcinome pulmonaire traités par chimiothérapie néoadjuvante. De plus, notre étude a permis de démontrer que quel que soit le stade et le traitement, l'infiltrat immunitaire reste un marqueur pronostique puissant dans les CBPNPC. Ceci souligne également l'intérêt de l'utilisation combinée de la chimiothérapie et de l'immunothérapie.

DISCUSSION GENERALE

Le but de notre travail était d'étudier l'association des paramètres liés à la cellule tumorale avec son environnement immunitaire dans les carcinomes pulmonaires. Nous avons ainsi analysé les caractéristiques morphologiques et moléculaires des tumeurs et leur association avec la présence de cellules immunitaires au sein des tumeurs, ainsi que l'impact pronostique de ces différents paramètres.

Les adénocarcinomes pulmonaires sont des tumeurs morphologiquement et génétiquement hétérogènes

Les carcinomes pulmonaires, en particulier les adénocarcinomes sont des tumeurs très hétérogènes, tant dans leur aspect morphologique, représenté par la diversité des architectures tumorales, que dans leurs voies de signalisation oncogénique. Cette diversité tumorale est associée aux caractéristiques propres du patient, comme les facteurs environnementaux ou l'ethnie. En effet, les mutations *KRAS* sont essentiellement retrouvées chez les patients tabagiques, alors que les mutations *EGFR* sont retrouvées plutôt chez les non-tabagiques. De même, les mutations *EGFR* sont plus fréquentes chez les asiatiques atteints d'adénocarcinome que chez les caucasiens qui présentent plus fréquemment des altérations du gène *KRAS*. Dans notre cohorte, nous avons retrouvé une plus grande fréquence des mutations *EGFR* chez les sujets âgés, de sexe féminin et non tabagiques. Dans la population asiatique, les patients atteints de carcinome mutés *EGFR* sont plus souvent des femmes, non tabagiques mais d'âge jeune, ce qui peut suggérer qu'il existe des carcinogènes différents entre les ethnies. Dans notre série, les incidences des mutations *KRAS* et *EGFR* étaient légèrement différentes de celles rapportées dans la littérature. En effet, les mutations *KRAS* étaient plus fréquentes dans notre population (34%) que dans la littérature (25%). Les données sur les incidences de ces mutations dans la littérature sont essentiellement établies à partir des patients atteints de carcinome de stade avancé, ce qui ne correspond pas à notre population étudiée. Les patients inclus dans l'étude étaient des patients opérables, qui ne représentent qu'environ 30% des patients atteints de CBPNPC, ce qui exclut donc la grande majorité des tumeurs de stade avancé. Or, dans notre étude, presque 50% des patients atteints de tumeurs *KRAS* mutées était de stade I. D'autre part, il est possible que l'épidémiologie des mutations pendant la période d'étude (2001-2005), soit légèrement différente de celle actuelle, tout comme l'incidence des carcinomes épidermoïdes qui a diminuée ces dernières années, au profit des adénocarcinomes.

La morphologie des adénocarcinomes pulmonaires est associée à des altérations moléculaires particulières

Dans la première partie de ce travail, nous avons analysé une cohorte consécutive d'adénocarcinomes pulmonaires opérés et nous avons rapporté que certains paramètres morphologiques, en particulier certains sous-types d'adénocarcinomes, étaient associés au statut moléculaire *EGFR* et *KRAS* de ces tumeurs. Nos données étaient en accord avec celles de la littérature. Plusieurs études portant sur des adénocarcinomes pulmonaires retrouvent une association entre le sous-type mucineux et la présence de mutation *KRAS* (Tsuta *et al.*, 2013; Yoshizawa *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2012). Cette association n'est d'ailleurs pas retrouvée que dans les carcinomes mucineux d'origine pulmonaire, mais également ceux d'origine pancréatique (Krasinskas *et al.*, 2014), colique (Rosty *et al.*, 2013) ou ovarienne (Naik *et al.*, 2012). Puisque les mutations *KRAS* sont présentes dès les stades précoces de la carcinogénèse pulmonaire (Blons *et al.*, 2006), cela pourrait suggérer que les mutations oncogéniques du gène *KRAS*, pourraient être impliquées dans l'organisation tumorale et être responsables d'une architecture particulière des carcinomes. Par ailleurs, les mutations *EGFR* étaient significativement moins fréquentes dans les tumeurs de haut grade comparées aux tumeurs de grade intermédiaire. Cette donnée pourrait refléter le meilleur pronostic des tumeurs *EGFR* mutées, suggéré par certaines études (Izar *et al.*, 2013 ; Johnson *et al.*, 2013).

La morphologie des adénocarcinomes pulmonaires est un facteur pronostique indépendant

Les facteurs histologiques font partis des facteurs pronostiques les plus performants. Le stade TNM mais également les facteurs d'agressivité de la tumeur, tels que les embols vasculaires, sont associés au pronostic des tumeurs (Nentwich *et al.*, 2013; Maeda *et al.*, 2011; Kudo *et al.*, 2013; Harada *et al.*, 2011; Strano *et al.*, 2013). Nous avons montré que le grade histologique des adénocarcinomes était un facteur pronostique indépendant, alors que le statut moléculaire des gènes *KRAS* et *EGFR* n'était pas pronostique. Toutes les études concernant la valeur pronostique du grade histologique des adénocarcinomes s'accordent à dire que l'architecture tumorale joue un rôle majeur dans le pronostic des tumeurs. Cette architecture est tout d'abord directement corrélée au degré d'invasion de la tumeur, les bas grades ne sont pas ou peu invasif comparés aux autres grades. Mais probablement que l'architecture de la tumeur n'est pas le simple reflet du degré d'invasion de la tumeur, elle peut également être le reflet de la composition du stroma tumoral, c'est-à-dire du microenvironnement de la tumeur. En effet, le stroma des tumeurs de haut grade (solide, micropapillaire et mucineux) est

généralement moins abondant que celui des tumeurs de grade intermédiaire (lépidoïde, tubuleux et papillaire). Ceci pourrait suggérer que la croissance des tumeurs de haut grade est moins dépendante du stroma que les tumeurs de grade intermédiaire ; ou bien que la composition du stroma soit plus favorable à la progression tumorale dans les tumeurs de haut grade, comme le montre leur association plus fréquente à des embols vasculaires.

Concernant la valeur pronostique des gènes *EGFR* et *KRAS*, les études sont discordantes. Dans notre série, le faible nombre de tumeurs mutées *EGFR* ne permet pas de tirer de conclusion sur son rôle pronostique. En revanche, la présence de mutations *KRAS* dans notre cohorte d'adénocarcinomes pulmonaires ne semble pas être associée à un mauvais pronostic, comme le suggère le résultat d'une méta-analyse (Mascaux *et al.*, 2005). Il faut cependant noter que dans cette méta-analyse, obtenue à partir d'une analyse univariée rassemblant 34 études, la majorité des études (31) n'atteignait pas la significativité concernant la valeur pronostique de *KRAS*. Ainsi, la valeur pronostique des mutations *KRAS* reste à être validée à l'aide d'analyse multivariée sur de larges cohortes prospectives d'adénocarcinomes pulmonaires. D'autre part, une des limites de notre étude était l'absence de données sur la survie spécifique (décès liés au cancer) et la survie sans récurrence. Le statut mutationnel des gènes *KRAS* et *EGFR* pourrait être associé à une valeur pronostique sur la survie spécifique ou sur la survie sans récurrence, comme cela avait été montré dans la littérature (Ma *et al.*, 2008). D'ailleurs, cette hypothèse est confortée par le bénéfice de l'utilisation des inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR, sur la survie sans récurrence mais pas sur la survie globale (Fukuoka *et al.*, 2011).

La distribution des mutations *EGFR* est relativement homogène au sein des tumeurs primitives et de leurs métastases ganglionnaires

L'analyse d'une cohorte de patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires *EGFR* mutés a montré que la distribution de mutation oncogénique comme celle du gène *EGFR*, était relativement homogène au sein d'une tumeur primitive et que ces mutations étaient également présentes au stade ganglionnaire métastatique. L'hétérogénéité des mutations au sein des tumeurs est un défi thérapeutique car il pourrait remettre en cause la validité des biopsies pour le diagnostic moléculaire. Un article de Gerlinger *et al.*, concernant des carcinomes rénaux avait démontré qu'il existait une grande hétérogénéité mutationnelle au sein des tumeurs ; cependant cette étude montrait également que la distribution des gènes majeurs pour le développement tumoral des carcinomes rénaux, comme *VHL* n'était pas hétérogène (Gerlinger *et al.*, 2013). Les études concernant la distribution des mutations *EGFR* dans les

carcinomes pulmonaires sont discordantes. Contrairement à nos résultats, plusieurs études rapportent une distribution hétérogène des mutations. Cependant, cette hétérogénéité peut s'expliquer par plusieurs raisons : certaines de ces études incluaient des patients traités par anti-*EGFR* (Jiang *et al.*, 2008), d'autres utilisaient des techniques de détection moins sensibles, comme le séquençage direct (Sakurada *et al.*, 2008), et enfin certaines utilisaient des techniques de microdissection laser (Bai et al, 2013). Dans notre plateforme de biologie moléculaire, nous avons fait le choix de ne pas avoir recourt à la microdissection laser. Tout d'abord parce que cette technique n'est pas adaptée à l'utilisation en routine car elle induit une augmentation du délai et du coût de la recherche des mutations. Mais également, parce que les erreurs lors de l'amplification d'un faible nombre de cellules tumorales peuvent être faussement interprétées comme des mutations. Nos résultats n'éliminent pas la présence de sous-clone minoritaire constitué par des cellules tumorales ne possédant pas de mutation *EGFR*, mais ils témoignent de la présence d'un assez grand nombre de cellules tumorales *EGFR* mutées, permettant leur détection par nos techniques de routine pour le diagnostic moléculaire.

L'analyse comparée des ganglions métastatiques et des tumeurs primitives pour 9 patients ne montrait pas de différence du statut mutationnel entre la tumeur primitive et les ganglions métastatiques. Cependant, le faible nombre de patients possédant des prélèvements à la fois de la tumeur primitive et des métastases, ne permet probablement pas d'affirmer l'homogénéité de distribution des mutations *EGFR* entre la tumeur primitive et ses métastases. Il est important de noter que l'analyse du statut *EGFR* tout au long de la progression tumorale est difficile à réaliser en pratique car peu de patients sont rebiopsiés lors des récives.

A la différence des mutations, l'étude du nombre de copie du gène *EGFR* a montré une hétérogénéité au sein de la même tumeur, ce qui avait également été démontré par d'autres (Bai et al, 2013 ; Yatabe *et al.*, 2011). Nous avons conclu que le nombre de copie pouvait influencer la détection des mutations, car dans certains prélèvements pauvres en cellules tumorales, une augmentation du nombre de copie pouvait améliorer la détection des mutations. D'après certaines études, l'amplification du gène *EGFR* surviendrait tardivement pendant la cancérogénèse pulmonaire (Soh *et al.*, 2008 ; Yatabe *et al.*, 2011) et serait associée aux secteurs invasifs des tumeurs, plutôt qu'aux secteurs lépidiques ou aux tumeurs préinvasives (Awaya *et al.*, 2005). Dans une tumeur, nous avons retrouvé un nombre de copie augmenté dans le secteur d'architecture solide (haut grade), alors que le secteur lépidique (grade intermédiaire) ne présentait pas d'augmentation du nombre de copie. Néanmoins, cette constatation n'était pas reproduite dans les autres tumeurs possédant des secteurs de haut

grade et de grade intermédiaire. De plus, nous avons retrouvé une augmentation du nombre de copie dans une lésion préinvasive (hyperplasie pneumocytaire atypique). Cette discordance avec la littérature pourrait s'expliquer par notre technique d'évaluation du nombre de copie, qui à la différence de la technique FISH, ne permet pas de différencier une polysomie d'une amplification. Dans notre étude, nos résultats pourraient être liés à une polysomie plutôt qu'à une amplification.

L'environnement immunitaire est associé au pronostic des patients atteints d'un carcinome pulmonaire

Il est maintenant admis que l'environnement immunitaire joue un rôle majeur dans le contrôle des tumeurs et que sa valeur pronostique est indépendante du stade TNM des tumeurs (Mlecnik *et al*, 2011). Notre équipe avait supposé que la présence de structures lymphoïdes tertiaires (SLT) au sein des carcinomes pulmonaires était probablement le témoin d'une réponse immunitaire anti-tumorale locale, puisque la présence de ces SLT était associée à une meilleure survie chez les patients atteints de carcinomes pulmonaires non à petites cellules opérés, de tous stades (Dieu-Nosjean *et al.*, 2008; Goc *et al.*, 2014). Ces structures lymphoïdes tertiaires ont une organisation similaire au ganglion lymphatique, ce qui pourrait permettre le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale locale, de type cytotoxique, grâce à une présentation antigénique par les cellules dendritiques matures et un recrutement des lymphocytes T CD8+. Ces SLT sont essentiellement retrouvées dans la zone d'invasion de la tumeur, c'est-à-dire à l'interface tissu tumoral/tissu non tumoral. Cette localisation particulière pourrait suggérer la mise en place d'une « barrière immunitaire » pour empêcher la progression tumorale ; ou bien au contraire, cela pourrait traduire la difficulté des cellules immunitaires à pénétrer la tumeur, en raison notamment de la présence de molécule chimiorépulse, comme cela a déjà été démontré avec la neuropilin1 (Lepelletier *et al*, 2007). Les lymphocytes T CD8+ ont également une localisation particulière, ils sont principalement retrouvés dans le stroma tumoral mais également directement au contact des cellules tumorales. Cette localisation privilégiée au contact des cellules tumorales pourrait traduire une cytotoxicité directe des lymphocytes CD8+ sur les cellules tumorales.

En plus de la diversité morphologique et moléculaire des tumeurs pulmonaires, l'environnement immunitaire associé aux tumeurs est également hétérogène entre les patients. Une de nos hypothèses pour expliquer cette hétérogénéité était que la cellule tumorale pouvait façonner son environnement immunitaire et que l'impact pronostique des cellules immunitaires pouvait être lié aux caractéristiques des cellules tumorales.

Un précédent travail portant sur des métastases pulmonaires de carcinomes d'origine colorectale et rénale, nous avait permis de conforter cette hypothèse car il montrait que selon l'origine des cellules tumorales, la composition et la valeur pronostique de cet environnement immunitaire variait. En effet, la densité des CD matures et des lymphocytes T CD8⁺ était plus grande dans les métastases d'adénocarcinomes colorectaux que dans les métastases de carcinome rénaux. De plus, la densité de ces cellules immunitaires était équivalente entre la tumeur primitive et sa métastase, ce qui suggérait que la tumeur reconstituait son environnement immunitaire après le processus de migration métastatique. Enfin, l'impact pronostique de la densité de CD matures et des lymphocytes CD8⁺ était différent entre ces tumeurs d'origine différente : la présence d'une forte densité en CD matures était associée à un mauvais pronostic dans les carcinomes d'origine rénale alors qu'elle était associée à un bon pronostic dans les adénocarcinomes d'origine colorectale (Remark *et al*, 2013).

Dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules, notre équipe avait démontré que la forte densité de CD matures et de cellules CD8⁺ était associée à un meilleur pronostic, quel que soit le type histologique ; mais que la densité en CD matures pouvait varier selon le type histologique. Les tumeurs possédant des faibles densités de CD matures semblaient être plus fréquemment des carcinomes épidermoïdes que des adénocarcinomes.

Dans notre travail, nous avons analysé uniquement les adénocarcinomes pulmonaires car les mutations *EGFR* et *KRAS* sont plus fréquentes dans ce type histologique que dans les carcinomes épidermoïdes. Nous avons ainsi analysé la densité et le rôle pronostique des CD matures et des lymphocytes T CD8⁺, selon les caractéristiques morphologiques et moléculaires des adénocarcinomes opérés, de tous stades. Dans cette population, la forte densité de CD matures et de cellules CD8⁺ était associée à un meilleur pronostic.

Nous avons montré que la morphologie des adénocarcinomes, et en particulier les grades histologiques, n'était pas associée à un infiltrat immunitaire particulier. En revanche, la densité de CD matures était plus faible dans les adénocarcinomes de stades avancés comparé aux stades précoces. Ceci suggère deux hypothèses : soit les tumeurs de stades avancés sont plus agressives et moins infiltrées en CD matures dès le début du développement tumoral, ce qui peut expliquer en partie leur mauvais pronostic ; soit l'infiltration en CD matures diminue au cours de la progression tumorale en raison du développement de mécanismes d'échappement au système immunitaire.

La densité en lymphocytes CD8⁺ variait en fonction de facteurs environnementaux, comme le tabagisme. Les tumeurs des patients tabagiques étaient associées à une plus grande densité en lymphocytes CD8⁺ comparées aux tumeurs des patients non tabagiques. Or, il a été démontré

que les tumeurs pulmonaires de patients tabagiques présentaient plus de mutations que les tumeurs des patients non tabagiques (Govindan et al, 2012). La présence de ces mutations pourrait générer de multiples néoantigènes qui induiraient une réponse immunitaire plus marquée.

Le statut mutationnel *KRAS* et *EGFR* des adénocarcinomes pulmonaires est associé à une signature immunitaire intra-tumorale spécifique

La présence d'altération moléculaire *KRAS* ou *EGFR* était associée à une variation de la densité des CD matures : les tumeurs *KRAS* mutées avaient une densité en CD matures moins importante que les tumeurs WT (sauvages pour *EGFR* et *KRAS*), alors que les tumeurs *EGFR* mutées étaient plus infiltrées en CD matures que les tumeurs WT.

Malgré la présence de forte densité de CD matures dans les tumeurs *EGFR* mutées, il n'y avait pas de bénéfice de survie pour les patients porteurs de ce type de tumeurs. Cependant, il était difficile de conclure sur le meilleur pronostic de ces tumeurs, en raison du faible nombre de tumeurs *EGFR* mutées. Concernant les tumeurs *KRAS* mutées, il est possible que la valeur pronostique négative rapportée par certaines études, soit en partie liée à la faible densité de CD matures.

Il n'y avait pas de différence significative de densité en lymphocytes CD8⁺ selon le statut mutationnel d'*EGFR* et de *KRAS*. Cependant, il y avait une tendance à une plus forte densité de cellules CD8⁺ dans les tumeurs *KRAS* mutées. Ceci pouvait être le reflet de l'exposition tabagique fréquente des patients porteurs de tumeurs *KRAS* mutées, car comme nous l'avons vu, les patients tabagiques possédaient significativement plus de cellules CD8⁺ intratumorales que les patients non tabagiques.

L'analyse de sous-groupe de patients selon le statut mutationnel *KRAS* des tumeurs, nous a permis d'évaluer et de comparer la valeur pronostique de la densité de CD matures et de la densité de lymphocytes CD8⁺, en fonction du statut mutationnel de ce gène. Dans les tumeurs WT (sauvages pour *EGFR* et *KRAS*), la densité de CD matures était associée à une meilleure valeur pronostique que la densité de lymphocytes CD8⁺ ; alors que dans les tumeurs *KRAS* mutées, la valeur pronostique de la densité de lymphocytes CD8⁺ était associée à une meilleure valeur pronostique que la densité de CD matures. En effet, les patients possédant une tumeur WT fortement infiltrée en CD matures (DC-Lamp^{High}) et faiblement infiltrée en cellules CD8⁺ (CD8^{Low}) avaient un pronostic presque similaire aux patients porteurs de tumeurs WT DC-Lamp^{High} et CD8^{High}. En d'autres termes, même en présence d'une forte

densité de lymphocytes CD8⁺, une forte infiltration de CD matures intratumorales était requise pour l'association avec un pronostic de survie favorable. Les CD matures semblent donc nécessaires pour l'établissement d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace, dans les tumeurs WT.

Au contraire, les patients possédant une tumeur *KRAS* mutées DC-Lamp^{Low} et CD8^{High} avaient un pronostic presque similaire aux patients porteurs de tumeurs *KRAS* mutées DC-Lamp^{High} et CD8^{High}. Ces données suggèrent que l'activation cytotoxique des lymphocytes CD8⁺ dans les tumeurs *KRAS* mutées ne nécessite pas les CD matures comme cellules présentatrices. Il est possible que les lymphocytes CD8⁺ puissent être activés uniquement par les cellules tumorales.

Ainsi, si la valeur pronostique des cellules CD8⁺ varie entre les tumeurs *KRAS* mutées et les tumeurs WT, cela peut suggérer plusieurs hypothèses : soit le niveau d'activation ou la fonctionnalité des cellules CD8⁺ est différent ; soit leur présence est corrélée à l'existence d'un autre facteur pronostique (comme par exemple un autre type de cellule immunitaire).

L'analyse en sous-groupe des populations en fonction du statut *EGFR*, n'était pas possible en raison du faible nombre de tumeurs *EGFR* mutées, mais également car la plupart des tumeurs *EGFR* étaient DC-Lamp^{High} (27/33).

L'environnement immunitaire est présent dans les carcinomes pulmonaires après chimiothérapie néoadjuvante

Nous avons analysé la densité en CD matures et en lymphocytes T CD8⁺ dans une cohorte de carcinomes pulmonaires de stade III-N2, opérés après chimiothérapie néoadjuvante.

Le but de ce travail était de montrer si la chimiothérapie pouvait induire des modifications sur la composition et la valeur pronostique de l'environnement immunitaire. En effet, plusieurs études avaient démontré que la chimiothérapie pouvait modifier la réponse immunitaire anti-tumorale (Zitvogel *et al.*, 2008; Turtle *et al.*, 2009 ; Tsuchikawa *et al.*, 2012 ; Ruffell *et al.*, 2012 ; Allan *et al.*, 2004; White *et al.*, 1998 ; Hornychova *et al.*, 2008; Mullins *et al.*, 1999; Tsuda *et al.*, 2007; Apetoh *et al.*, 2007; Ghiringhelli *et al.*, 2004).

Nous avons montré la présence d'un infiltrat immunitaire dans les tumeurs traitées par chimiothérapie néoadjuvante, ce qui pourrait suggérer que même si la chimiothérapie modifie l'environnement immunitaire, celui-ci pourrait se reconstituer après l'arrêt de la chimiothérapie. La comparaison des densités de CD matures et de lymphocytes T CD8⁺ dans deux cohortes différentes de patients atteints de CBPNPC, non traités et traités par

chimiothérapie néoadjuvante, n'a pas permis de retrouver de différence significative. Néanmoins, seule la comparaison de l'environnement immunitaire avant et après chimiothérapie pour une même tumeur permettrait de confirmer que la chimiothérapie ne modifie pas ou peu cet environnement immunitaire. Malheureusement, cette étude n'est pas réalisable dans les carcinomes pulmonaires, car les prélèvements biopsiques avant chimiothérapie ne permettent pas l'étude de l'environnement immunitaire qui nécessite des prélèvements de grande taille. Une étude de ce type a néanmoins été réalisée dans les carcinomes mammaires, les prélèvements avant chimiothérapie correspondaient à des macrobiopsies réalisées sous mammotome. Dans cette étude, la chimiothérapie modifiait la densité de cellules FoxP3+, qui sont immunorégulatrices, mais pas celle des cellules CD8+. La densité de cellules CD8+ et FoxP3+, déterminée dans les tumeurs après chimiothérapie était associée à la survie, alors que cette même densité n'était pas pronostique dans les mêmes tumeurs avant chimiothérapie (Ladoire *et al*, 2011). Ces résultats suggèrent que la chimiothérapie pourrait avoir un rôle sur la fonctionnalité des cellules CD8+, probablement par la modification de l'environnement immunorégulateur. Ces résultats obtenus dans le cancer du sein ne sont pas validés dans le cancer pulmonaire. Il paraît intéressant d'analyser, dans notre population de cancer pulmonaire opéré après chimiothérapie néoadjuvante, les populations FoxP3+ et d'évaluer le ratio FoxP3/CD8 qui pourrait être le marqueur pronostic le plus pertinent. Une autre stratégie d'analyse de l'environnement immunitaire avant et après chimiothérapie serait la détermination d'une signature génique remplaçant ou complétant l'étude phénotypique des populations immunitaires.

Par ailleurs, nous avons analysé la réponse pathologique à la chimiothérapie néoadjuvante et évalué sa valeur pronostique. Nous avons confirmé la faible chimiosensibilité des CBPNPC. Les patients inclus dans cette étude, étaient les meilleurs répondeurs à la chimiothérapie, caractérisés soit par une réponse objective, soit par une maladie stable, selon les critères RECIST. Malgré tout, seuls 27/122 (22%) patients avaient une réponse complète (N=15) ou majeure (N=12), c'est-à-dire un résidu tumoral viable $\leq 10\%$, et 51 patients sur 122 (42%) avaient un downstaging ganglionnaire, évalué par l'étude histologique.

La réponse pathologique et l'environnement immunitaire sont deux marqueurs pronostiques indépendants après chimiothérapie néoadjuvante

La présence de fortes densités de CD matures et de lymphocytes T CD8+ était associée à un bon pronostic dans ces carcinomes pulmonaires non à petites cellules traités par chimiothérapie néoadjuvante. La réponse tumorale, évaluée comme le pourcentage de cellules

tumorales résiduelles viables, représentait également un bon marqueur pronostique, comme cela avait été décrit dans d'autres études (Pataer *et al.*, 2012 ; Stefani *et al.*, 2010; Garrido *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2002). Ainsi, si la chimiothérapie n'était pas associée à des modifications notables de l'infiltrat immunitaire, elle était associée à des modifications parfois majeures de la tumeur.

La réponse radiologique, établie à partir des critères RECIST, a été démontré associée à une valeur pronostique positive chez les patients opérés après chimiothérapie néoadjuvante (William *et al.*, 2013 ; Tanvetyanon *et al.*, 2008) mais elle n'est pas toujours corrélée à la réponse pathologique. Dans l'étude de William *et al.*, comparant la valeur pronostique de la réponse radiologique et de la réponse pathologique (pourcentage de cellules tumorales viables), la réponse pathologique était associée à une meilleure valeur pronostique que la réponse radiologique. En effet, certaines tumeurs définies comme répondeuses histologiquement étaient radiologiquement stables car la distinction entre fibrose et tissu tumoral est difficilement appréciable en radiologie. Si la réponse radiologique ne permet pas d'identifier tous les répondeurs histologiques, se pose alors un problème thérapeutique car l'indication de résection chirurgicale après chimiothérapie est basée principalement sur cette réponse. Il a donc été proposé d'évaluer le volume de la tumeur, plutôt que sa taille dans la plus grande dimension en complément d'un PET-scanner, ce qui permettrait une meilleure identification des patients répondeurs (Lee *et al.*, 2010).

La réponse pathologique a été définie uniquement sur le pourcentage de cellules tumorales viables, car ni le pourcentage de nécrose, ni le pourcentage de fibrose n'étaient associés à une différence de survie significative dans les tumeurs traitées par chimiothérapie néoadjuvante. En revanche, dans les tumeurs non traitées par chimiothérapie, la littérature rapporte que le pourcentage de nécrose est associé à une valeur pronostique (Inoue *et al.*, 2008; Kiliçgün *et al.*, 2010; Gkogkou *et al.*, 2014). Ceci suggère que la nécrose, liée à la prolifération excessive de la tumeur, est un signe d'agressivité de celle-ci. Inversement, la nécrose des tumeurs traitées par chimiothérapie néoadjuvante, n'est pas associée à une valeur pronostique car elle doit être essentiellement liée à l'activité cytotoxique de la chimiothérapie plutôt qu'à l'agressivité de la tumeur.

Nous avons montré que la réponse pathologique évaluée grâce au pourcentage de cellules tumorales viables représentait un facteur pronostique indépendant du stade ypTNM. En effet, il est probable que les pronostics de deux tumeurs de même taille, l'une constituée majoritairement de fibrose et de rares cellules tumorales, et l'autre principalement constituée de cellules tumorales, soient différents, malgré le même stade ypTNM.

Bien que la réponse tumorale et l'infiltrat immunitaire représentent des facteurs pronostiques indépendants, il est intéressant de noter que l'infiltrat immunitaire était prédictif de la survie à long terme. Une mauvaise réponse pathologique associée à une densité faible de CD matures et de cellules CD8+ prédisait un mauvais pronostic. Mais, d'après nos résultats, il semblait que la survie à long terme des patients avec réponse pathologique partielle était meilleure que celle des patients avec réponse complète. Or, les patients qui possédaient une réponse tumorale complète (sans cellule tumorale viable) possédaient des tumeurs pauvres en CD matures, comparativement aux patients qui présentaient une réponse partielle. Ces résultats pourraient suggérer que la mise en place d'une réaction immunitaire anti-tumorale efficace nécessite la présence de cellules tumorales, néanmoins ces résultats doivent être confirmés sur un plus grand nombre de patients avec réponse partielle et complète.

Au total, nos résultats suggèrent que la réponse immunitaire aurait un rôle bénéfique à plus long terme expliquant partiellement les données actuelles de la littérature sur les effets bénéfiques de l'immunothérapie dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules (Topalian *et al*, 2012 ; Brahmer *et al*, 2012).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble de nos résultats suggère que l'infiltrat immunitaire est intimement lié à la cellule tumorale et que sa composition et son impact pronostique pourraient être associés aux caractéristiques de la tumeur et en particulier à ces caractéristiques moléculaires.

L'environnement immunitaire est un système complexe et dynamique qui fait intervenir un grand nombre de cellules immunitaires, tant de l'immunité innée que de l'immunité adaptative. Nous avons vu que selon le statut moléculaire des tumeurs, la valeur pronostique de la densité d'une population immunitaire pouvait varier. Ainsi, il paraît nécessaire de compléter notre travail par l'analyse des autres cellules immunitaires du microenvironnement, ou des molécules impliquées dans la réponse immunitaire, telles que les cytokines et chimiokines. L'analyse des cellules immunitaires et en particulier de l'immunité innée est actuellement en cours dans l'équipe. La corrélation de ces analyses aux données cliniques, morphologiques et moléculaires, comme nous l'avons déjà fait pour les cellules dendritiques matures et les lymphocytes CD8+, pourrait permettre d'identifier les autres acteurs du contrôle ou de la croissance tumorale dans les carcinomes pulmonaires.

De plus, des données concernant le degré d'activation et la fonctionnalité des cellules CD8+, obtenues à partir de tumeurs pulmonaires fraîches étudiées par cytométrie en flux sont en cours d'analyse dans notre équipe, nous envisageons de caractériser le profil moléculaire de ces tumeurs pour confronter ces différentes données.

Enfin, parmi les tumeurs analysées dans cette thèse, certaines ont fait l'objet d'une étude de l'expression de gènes impliqués notamment dans la réponse immunitaire. Les données de cette étude confrontées à nos résultats pourraient apporter des informations sur l'orientation de la réponse immunitaire, selon le statut mutationnel.

L'analyse exhaustive des autres altérations moléculaires des carcinomes pulmonaires par des techniques de séquençage haut débit, pourrait permettre de mieux séparer les différents sous types de tumeur, et de leur associer un environnement immunitaire particulier et un impact pronostic.

Notre travail montre la grande hétérogénéité de l'environnement immunitaire intra-tumoral des patients atteints d'un carcinome pulmonaire non à petites cellules et probablement l'inégalité des individus à élaborer une réponse immunitaire anti-tumorale efficace. Nous avons émis l'hypothèse que cette hétérogénéité pouvait être liée aux caractéristiques des cellules tumorales. Mais il est probable que la constitution de la réponse immunitaire dépende également d'autres paramètres comme l'environnement auquel est exposé le patient et en

particulier l'exposition tabagique, ou même des facteurs génétiques constitutionnels du patient.

Pour analyser les rôles respectifs de l'environnement auquel est exposé le patient, et les caractéristiques individuelles du système immunitaire d'un individu, nous envisageons d'étudier des patients porteurs de plusieurs tumeurs pulmonaires synchrones et/ou métachrones. Le but étant de déterminer et de comparer la composition de l'environnement immunitaire dans plusieurs tumeurs, développées chez un même patient, dont les caractéristiques morphologiques et moléculaires sont similaires ou différentes. Ceci permettra d'analyser l'interaction entre les cellules tumorales et leur environnement immunitaire, indépendamment de l'environnement du patient, tel que le tabagisme, ou bien les facteurs intrinsèques au patient.

A l'heure de la prise en charge plus complexe des patients atteints de plusieurs tumeurs pulmonaires synchrones, nos données permettront peut-être de guider la thérapeutique. En effet, l'aspect morphologique est parfois insuffisant pour répondre à la question, s'agit-il de la même tumeur ou bien s'agit-il de tumeurs primitives pulmonaires différentes ? Le profil moléculaire de ces tumeurs grâce à une analyse extensive de plusieurs gènes permettra également de mieux caractériser ces tumeurs.

Pour terminer, les données actuelles sur les effets bénéfiques de l'immunothérapie dans les tumeurs pulmonaires, confirment la nécessité de mieux caractériser les populations immunitaires intratumorales. Comme le suggèrent nos résultats, il existe une interaction entre la tumeur et son environnement immunitaire. Aussi, les objectifs de la thérapie personnalisée ne devraient pas seulement se limiter aux caractéristiques des cellules tumorales mais également considérer les caractéristiques des populations immunitaires.

REFERENCES

- Acquaviva, J., Smith, D.L, Sang, J, Friedland, J.C, He, S, Sequeira, M, Zhang, C, Wada, Y Proia, D.A (2012) Targeting KRAS-mutant non-small cell lung cancer with the Hsp90 inhibitor ganetespib. *Mol Cancer Ther* 11:2633-2643.
- Ahn, H.K., Choi, Y, Han, J.H, Ahn, Y.C, Kim, K, Kim, J, Shim, Y.M, Um, S, Kim, H, Kwon, O.J, Sun, J, Ahn, J.S, Park, K Ahn, M (2013) Epidermal growth factor receptor mutation and treatment outcome of mediastinoscopic N2 positive non-small cell lung cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy followed by surgery. *Lung Cancer* 79:300-306.
- Alifano, M., Falcoz, P.E, Seegers, V, Roche, N, Schussler, O, Younes, M, Antonacci, F, Forgez, P, Dechartres, A, Massard, G, Damotte, D Régnard, J (2011) Preresection serum C-reactive protein measurement and survival among patients with resectable non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 142:1161-1167.
- Al-Shibli, K.I., Donnem, T, Al-Saad, S, Persson, M, Bremnes, R.M Busund, L (2008) Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 14:5220-5227.
- Allan, C.P., Turtle, C.J, Mainwaring, P.N, Pyke, C Hart, D.N.J (2004) The immune response to breast cancer, and the case for DC immunotherapy. *Cytotherapy* 6:154-163.
- Altman, D.G., Lausen, B, Sauerbrei, W Schumacher, M (1994) Dangers of using "optimal" cutpoints in the evaluation of prognostic factors. *J Natl Cancer Inst* 86:829-835.
- Altorki, N.K., Yip, R, Hanaoka, T, Bauer, T, Aye, R, Kohman, L, Sheppard, B, Thurer, R, Andaz, S, Smith, M, Mayfield, W, Grannis, F, Korst, R, Pass, H, Straznicka, M, Flores, R, Henschke, C.I (2014) Sublobar resection is equivalent to lobectomy for clinical stage 1A lung cancer in solid nodules. *J Thorac Cardiovasc Surg* 147:754-62; Discussion 762-4.
- Amos, C.I., Wu, X, Broderick, P, Gorlov, I.P, Gu, J, Eisen, T, Dong, Q, Zhang, Q, Gu, X, Vijayakrishnan, J, Sullivan, K, Matakidou, A, Wang, Y, Mills, G, Doheny, K, Tsai, Y, Chen, W.V, Shete, S, Spitz, M.R Houlston, R.S (2008) Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet* 40:616-622.
- Apetoh, L., Ghiringhelli, F, Tesniere, A, Obeid, M, Ortiz, C, Criollo, A, Mignot, G, Maiuri, M.C, Ullrich, E, Saulnier, P, Yang, H, Amigorena, S, Ryffel, B, Barrat, F.J, Saftig, P, Levi, F, Lidereau, R, Nogues, C, Mira, J, Chompret, A, Joulin, V, Clavel-Chapelon, F, Bourhis, J, André, F, Delaloge, S, Tursz, T, Kroemer, G Zitvogel, L (2007) Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13:1050-1059.
- Arcila, M.E., Chaft, J.E, Nafa, K, Roy-Chowdhuri, S, Lau, C, Zaidinski, M, Paik, P.K, Zakowski, M.F, Kris, M.G Ladanyi, M (2012) Prevalence, clinicopathologic associations, and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 18:4910-4918.

Arcila, M.E., Oxnard, G.R, Nafa, K, Riely, G.J, Solomon, S.B, Zakowski, M.F, Kris, M.G, Pao, W, Miller, V.A Ladanyi, M (2011) Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay. *Clin Cancer Res* 17:1169-1180.

Au, N.H.C., Gown, A.M, Cheang, M, Huntsman, D, Yorida, E, Elliott, W.M, Flint, J, English, J, Gilks, C.B Grimes, H.L (2004) P63 expression in lung carcinoma: a tissue microarray study of 408 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 12:240-247.

Awaya H, Takeshima Y, Furonaka O, Kohno N, Inai K. (2005) Gene amplification and protein expression of EGFR and HER2 by chromogenic in situ hybridisation and immunohistochemistry in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *J Clin Pathol.* 58(10):1076-80.

Bai, H., Wang, Z, Wang, Y, Zhuo, M, Zhou, Q, Duan, J, Yang, L, Wu, M, An, T, Zhao, J Wang, J (2013) Detection and clinical significance of intratumoral EGFR mutational heterogeneity in Chinese patients with advanced non-small cell lung cancer. *PLoS One* 8:e54170.

Bang, Y., Van Cutsem, E, Feyereislova, A, Chung, H.C, Shen, L, Sawaki, A, Lordick, F, Ohtsu, A, Omuro, Y, Satoh, T, Aprile, G, Kulikov, E, Hill, J, Lehle, M, Rüschoff, J, Kang, Y (2010) Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 376:687-697.

Bean, J., Brennan, C, Shih, J, Riely, G, Viale, A, Wang, L, Chitale, D, Motoi, N, Szoke, J, Broderick, S, Balak, M, Chang, W, Yu, C, Gazdar, A, Pass, H, Rusch, V, Gerald, W, Huang, S, Yang, P, Miller, V, Ladanyi, M, Yang, C Pao, W (2007) MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20932-20937.

Beau-Faller, M., Ruppert, A, Voegeli, A, Neuville, A, Meyer, N, Guerin, E, Legrain, M, Menecier, B, Wihlm, J, Massard, G, Quoix, E, Oudet, P Gaub, M.P (2008) MET gene copy number in non-small cell lung cancer: molecular analysis in a targeted tyrosine kinase inhibitor naïve cohort. *J Thorac Oncol* 3:331-339.

Bell, D.W., Gore, I, Okimoto, R.A, Godin-Heymann, N, Sordella, R, Mulloy, R, Sharma, S.V, Brannigan, B.W, Mohapatra, G, Settleman, J Haber, D.A (2005) Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. *Nat Genet* 37:1315-1316.

Blackburn, C.C. Manley, N.R (2004) Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat Rev Immunol* 4:278-289.

Blasberg, J.D., Pass, H.I Donington, J.S (2010) Sublobar resection: a movement from the Lung Cancer Study Group. *J Thorac Oncol* 5:1583-1593.

Blons, H., Côté, J, Le Corre, D, Riquet, M, Fabre-Guilevin, E, Laurent-Puig, P Danel, C (2006) Epidermal growth factor receptor mutation in lung cancer are linked to bronchioloalveolar differentiation. *Am J Surg Pathol* 30:1309-1315.

Boland, J.M., Erdogan, S, Vasmatazis, G, Yang, P, Tillmans, L.S, Johnson, M.R.E, Wang, X, Peterson, L.M, Halling, K.C, Oliveira, A.M, Aubry, M.C Yi, E.S (2009) Anaplastic lymphoma kinase immunoreactivity correlates with ALK gene rearrangement and transcriptional up-regulation in non-small cell lung carcinomas. *Hum Pathol* 40:1152-1158.

Brahmer, J.R., Tykodi, S.S, Chow, L.Q.M, Hwu, W, Topalian, S.L, Hwu, P, Drake, C.G, Camacho, L.H, Kauh, J, Odunsi, K, Pitot, H.C, Hamid, O, Bhatia, S, Martins, R, Eaton, K, Chen, S, Salay, T.M, Alaparthi, S, Grosso, J.F, Korman, A.J, Parker, S.M, Agrawal, S, Goldberg, S.M, Pardoll, D.M, Gupta, A Wigginton, J.M (2012) Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366:2455-2465.

Brinton, L.A., Gierach, G.L, Andaya, A, Park, Y, Schatzkin, A, Hollenbeck, A.R Spitz, M.R (2011) Reproductive and hormonal factors and lung cancer risk in the NIH-AARP Diet and Health Study cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20:900-911.

Bromwich, E.J., McArdle, P.A, Canna, K, McMillan, D.C, McNicol, A, Brown, M Aitchison, M (2003) The relationship between T-lymphocyte infiltration, stage, tumour grade and survival in patients undergoing curative surgery for renal cell cancer. *Br J Cancer* 89:1906-1908.

Brunner, K.T., Mauel, J, Cerottini, J.C Chapuis, B (1968) Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 14:181-196.

Burnet, F.M. (1967). Immunological aspects of malignant disease. *The Lancet* 289, 1171–1174.

Burnet, M. (1957). *Cancer—A Biological Approach: I. The Processes Of Control. II. The Significance of Somatic Mutation.* *Br. Med. J.* 1, 779.

Cabillic F, Gros A, Dugay F, Begueret H, Mesturoux L, Chiforeanu DC, Dufrenot L, Jauffret V, Dachary D, Corre R, Lespagnol A, Soler G, Dagher J, Catros V, Le Calve M, Merlio JP, Belaud-Rotureau MA. (2014). Parallel FISH and immunohistochemical studies of ALK status in 3244 non-small-cell lung cancers reveal major discordances. *J Thorac Oncol.* Mar;9(3):295-306.

Cai, W., Niu, G Chen, X (2008) Multimodality imaging of the HER-kinase axis in cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35:186-208.

Calvo, E. Baselga, J (2006) Ethnic differences in response to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *J Clin Oncol* 24:2158-2163.

Camidge, D.R., Skokan, M, Kiatsimkul, P, Helfrich, B, Lu, X, Barón, A.E, Schulte, N, Maxson, D, Aisner, D.L, Franklin, W.A, Doebele, R.C Varella-Garcia, M (2013) Native and

rearranged ALK copy number and rearranged cell count in non-small cell lung cancer: Implications for ALK inhibitor therapy. *Cancer* 22:3968-7.

Camidge, D.R., Bang, Y, Kwak, E.L, Iafrate, A.J, Varella-Garcia, M, Fox, S.B, Riely, G.J, Solomon, B, Ou, S.I, Kim, D, Salgia, R, Fidias, P, Engelman, J.A, Gandhi, L, Jänne, P.A, Costa, D.B, Shapiro, G.I, Lorusso, P, Ruffner, K, Stephenson, P, Tang, Y, Wilner, K, Clark, J.W Shaw, A.T (2012) Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol* 13:1011-1019.

Cappuzzo, F., Marchetti, A, Skokan, M, Rossi, E, Gajapathy, S, Felicioni, L, Del Grammastro, M, Sciarrotta, M.G, Buttitta, F, Incarbone, M, Toschi, L, Finocchiaro, G, Destro, A, Terracciano, L, Roncalli, M, Alloisio, M, Santoro, A Varella-Garcia, M (2009) Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol* 27:1667-1674.

Carragher, D.M., Rangel-Moreno, J Randall, T.D (2008) Ectopic lymphoid tissues and local immunity. *Semin Immunol* 20:26-42.

Catelinois, O., Rogel, A, Laurier, D, Billon, S, Hemon, D, Verger, P Tirmarche, M (2006) Lung cancer attributable to indoor radon exposure in france: impact of the risk models and uncertainty analysis. *Environ Health Perspect* 114:1361-1366.

Chaft, J.E., Oxnard, G.R, Sima, C.S, Kris, M.G, Miller, V.A Riely, G.J (2011) Disease flare after tyrosine kinase inhibitor discontinuation in patients with EGFR-mutant lung cancer and acquired resistance to erlotinib or gefitinib: implications for clinical trial design. *Clin Cancer Res* 17:6298-6303.

Chen, Z., Cheng, K, Walton, Z, Wang, Y, Ebi, H, Shimamura, T, Liu, Y, Tupper, T, Ouyang, J, Li, J, Gao, P, Woo, M.S, Xu, C, Yanagita, M, Altabef, A, Wang, S, Lee, C, Nakada, Y, Peña, C.G, Sun, Y, Franchetti, Y, Yao, C, Saur, A, Cameron, M.D, Nishino, M, Hayes, D.N, Wilkerson, M.D, Roberts, P.J, Lee, C.B, Bardeesy, N, Butaney, M, Chirieac, L.R, Costa, D.B, Jackman, D, Sharpless, N.E, Castrillon, D.H, Demetri, G.D, Jänne, P.A, Pandolfi, P.P, Cantley, L.C, Kung, A.L, Engelman, J.A Wong, K (2012) A murine lung cancer co-clinical trial identifies genetic modifiers of therapeutic response. *Nature* 483:613-617.

Chen, Z., Zhong, W, Zhang, X, Su, J, Yang, X, Chen, Z, Yang, J, Zhou, Q, Yan, H, An, S, Chen, H, Jiang, B, Mok, T.S Wu, Y (2012) EGFR mutation heterogeneity and the mixed response to EGFR tyrosine kinase inhibitors of lung adenocarcinomas. *Oncologist* 17:978-985.

Choi, Y.L., Takeuchi, K, Soda, M, Inamura, K, Togashi, Y, Hatano, S, Enomoto, M, Hamada, T, Haruta, H, Watanabe, H, Kurashina, K, Hatanaka, H, Ueno, T, Takada, S, Yamashita, Y, Sugiyama, Y, Ishikawa, Y Mano, H (2008) Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 68:4971-4976.

Church, T.R., Black, W.C, Aberle, D.R, Berg, C.D, Clingan, K.L, Duan, F, Fagerstrom, R.M, Gareen, I.F, Gierada, D.S, Jones, G.C, Mahon, I, Marcus, P.M, Sicks, J.D, Jain, A Baum, S

(2013) Results of initial low-dose computed tomographic screening for lung cancer. *N Engl J Med* 368:1980-1991.

Cipponi, A., Mercier, M, Seremet, T, Baurain, J, Théate, I, van den Oord, J, Stas, M, Boon, T, Coulie, P.G van Baren, N (2012) Neogenesis of lymphoid structures and antibody responses occur in human melanoma metastases. *Cancer Res* 72:3997-4007.

Ciuleanu, T., Brodowicz, T, Zielinski, C, Kim, J.H, Krzakowski, M, Laack, E, Wu, Y, Bover, I, Begbie, S, Tzekova, V, Cucevic, B, Pereira, J.R, Yang, S.H, Madhavan, J, Sugarman, K.P, Peterson, P, John, W.J, Krejcy, K Belani, C.P (2009) Maintenance pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care for non-small-cell lung cancer: a randomised, double-blind, phase 3 study. *Lancet* 374:1432-1440.

Coate, L.E., John, T, Tsao, M Shepherd, F.A (2009) Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 10:1001-1010.

Coffin, C.M., Patel, A, Perkins, S, Elenitoba-Johnson, K.S, Perlman, E Griffin, C.A (2001) ALK1 and p80 expression and chromosomal rearrangements involving 2p23 in inflammatory myofibroblastic tumor. *Mod Pathol* 14:569-576.

Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am J Med Sci.* 1893 May;105:487–511.

Coppola D, Nebozhyn M, Khalil F, Dai H, Yeatman T, Loboda A, Mulé JJ. (2011). Unique ectopic lymph node-like structures present in human primary colorectal carcinoma are identified by immune gene array profiling. *Am J Pathol.* 179(1):37-45.

Couraud, S., Zalcman, G, Milleron, B, Morin, F Souquet, P (2012) Lung cancer in never smokers--a review. *Eur J Cancer* 48:1299-1311.

Crystal, A.S. Shaw, A.T (2012) Variants on a theme: a biomarker of crizotinib response in ALK-positive non-small cell lung cancer?. *Clin Cancer Res* 18:4479-4481. Curado MP, Edwards B, Shin HR, *et al.* Cancer Incidence in Five Continents Vol. IX. *IARC Publications* 2007; 9

Dacic, S., Shuai, Y, Yousem, S, Otori, P Nikiforova, M (2010) Clinicopathological predictors of EGFR/KRAS mutational status in primary lung adenocarcinomas. *Mod Pathol* 23:159-168.

Dankort D, Filenova E, Collado M, Serrano M, Jones K, McMahon M. (2007). A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev.* 15;21(4):379-84.

Davies, H., Bignell, G.R, Cox, C, Stephens, P, Edkins, S, Clegg, S, Teague, J, Woffendin, H, Garnett, M.J, Bottomley, W, Davis, N, Dicks, E, Ewing, R, Floyd, Y, Gray, K, Hall, S, Hawes, R, Hughes, J, Kosmidou, V, Menzies, A, Mould, C, Parker, A, Stevens, C, Watt, S, Hooper, S, Wilson, R, Jayatilake, H, Gusterson, B.A, Cooper, C, Shipley, J, Hargrave, D, Pritchard-Jones, K, Maitland, N, Chenevix-Trench, G, Riggins, G.J, Bigner, D.D, Palmieri, G, Cossu, A, Flanagan, A, Nicholson, A, Ho, J.W.C, Leung, S.Y, Yuen, S.T, Weber, B.L, Seigler, H.F, Darrow, T.L, Paterson, H, Marais, R, Marshall, C.J, Wooster, R, Stratton, M.R Futreal, P.A (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949-954.

Debelenko, L.V., Raimondi, S.C, Daw, N, Shivakumar, B.R, Huang, D, Nelson, M Bridge, J.A (2011) Renal cell carcinoma with novel VCL-ALK fusion: new representative of ALK-associated tumor spectrum. *Mod Pathol* 24:430-442.

De Grève, J., Teugels, E, Geers, C, Decoster, L, Galdermans, D, De Mey, J, Everaert, H, Umelo, I, In't Veld, P Schallier, D (2012) Clinical activity of afatinib (BIBW 2992) in patients with lung adenocarcinoma with mutations in the kinase domain of HER2/neu. *Lung Cancer* 76:123-127.

Delsol, G., Lamant, L, Mariamé, B, Pulford, K, Dastugue, N, Brousset, P, Rigal-Huguet, F, al Saati, T, Cerretti, D.P, Morris, S.W Mason, D.Y (1997) A new subtype of large B-cell lymphoma expressing the ALK kinase and lacking the 2; 5 translocation. *Blood* 89:1483-1490.

Detterbeck, F.C., Boffa, D.J Tanoue, L.T (2009) The new lung cancer staging system. *Chest* 136:260-271.

Diederichsen, A.C.P., Hjelmberg, J.V.B, Christensen, P.B, Zeuthen, J Fenger, C (2003) Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer Immunol Immunother* 52:423-428.

Di Lillo, D.J., Hamaguchi, Y, Ueda, Y, Yang, K, Uchida, J, Haas, K.M, Kelsoe, G Tedder, T.F (2008) Maintenance of long-lived plasma cells and serological memory despite mature and memory B cell depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J Immunol* 180:361-371.

Didelot, A., Le Corre, D, Luscan, A, Cazes, A, Pallier, K, Emile, J, Laurent-Puig, P Blons, H (2012) Competitive allele specific TaqMan PCR for KRAS, BRAF and EGFR mutation detection in clinical formalin fixed paraffin embedded samples. *Exp Mol Pathol* 92:275-280.

Dieu-Nosjean, M., Antoine, M, Danel, C, Heudes, D, Wislez, M, Poulot, V, Rabbe, N, Laurans, L, Tartour, E, de Chaisemartin, L, Lebecque, S, Fridman, W Cadranel, J (2008) Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol* 26:4410-4417.

Ding, L., Getz, G, Wheeler, D.A, Mardis, E.R, McLellan, M.D, Cibulskis, K, Sougnez, C, Greulich, H, Muzny, D.M, Morgan, M.B, Fulton, L, Fulton, R.S, Zhang, Q, Wendl, M.C, Lawrence, M.S, Larson, D.E, Chen, K, Dooling, D.J, Sabo, A, Hawes, A.C, Shen, H, Jhangiani, S.N, Lewis, L.R, Hall, O, Zhu, Y, Mathew, T, Ren, Y, Yao, J, Scherer, S.E, Clerc, K, Metcalf, G.A, Ng, B, Milosavljevic, A, Gonzalez-Garay, M.L, Osborne, J.R, Meyer, R, Shi, X, Tang, Y, Koboldt, D.C, Lin, L, Abbott, R, Miner, T.L, Pohl, C, Fowell, G, Haipek, C, Schmidt, H, Dunford-Shore, B.H, Kraja, A, Crosby, S.D, Sawyer, C.S, Vickery, T, Sander, S, Robinson, J, Winckler, W, Baldwin, J, Chirieac, L.R, Dutt, A, Fennell, T, Hanna, M, Johnson, B.E, Onofrio, R.C, Thomas, R.K, Tonon, G, Weir, B.A, Zhao, X, Ziaugra, L, Zody, M.C, Giordano, T, Orringer, M.B, Roth, J.A, Spitz, M.R, Wistuba, I.I, Ozenberger, B, Good, P.J, Chang, A.C, Beer, D.G, Watson, M.A, Ladanyi, M, Broderick, S, Yoshizawa, A, Travis, W.D, Pao, W, Province, M.A, Weinstock, G.M, Varmus, H.E, Gabriel, S.B, Lander, E.S, Gibbs, R.A, Meyerson, M Wilson, R.K (2008) Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 455:1069-1075.

Doebele, R.C., Pilling, A.B, Aisner, D.L, Kutateladze, T.G, Le, A.T, Weickhardt, A.J, Kondo, K.L, Linderman, D.J, Heasley, L.E, Franklin, W.A, Varella-Garcia, M, Camidge, D.R (2012) Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 18:1472-1482.

Doll, R., Peto, R, Boreham, J, Sutherland, I (2004) Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ* 328:1519.

Douillard, J., Siena, S, Cassidy, J, Tabernero, J, Burkes, R, Barugel, M, Humblet, Y, Bodoky, G, Cunningham, D, Jassem, J, Rivera, F, Kocákova, I, Ruff, P, Błasińska-Morawiec, M, Šmakal, M, Canon, J, Rother, M, Oliner, K.S, Wolf, M, Gansert, J (2010) Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol* 28:4697-4705.

Drayton, D.L., Liao, S, Mounzer, R.H, Ruddle, N.H (2006) Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat Immunol* 7:344-353.

Dunn, G.P., Bruce, A.T, Ikeda, H, Old, L.J, Schreiber, R.D (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991-998.

Dunn, G.P., Old, L.J, Schreiber, R.D (2004) The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22:329-360.

Eerola, A.K., Soini, Y, Pääkkö, P (2000) A high number of tumor-infiltrating lymphocytes are associated with a small tumor size, low tumor stage, and a favorable prognosis in operated small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 6:1875-1881.

Ehrlich P. (1909) Ueber den jetzigen stand der Karzinomforschung. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde* 5, 272-290.

Elliott, B., Scolyer, R.A, Suci, S, Lebecque, S, Rimoldi, D, Gugerli, O, Musat, E, Sharma, R.N, Lienard, D, Keilholz, U, Testori, A, Eggermont, A, MacKie, R, Robert, C, Cook, M, Thompson, J.F, Angevin, E, Spatz, A (2007) Long-term protective effect of mature DC-LAMP+ dendritic cell accumulation in sentinel lymph nodes containing micrometastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 13:3825-3830.

Ellison, G., Zhu, G, Moulis, A, Dearden, S, Speake, G, McCormack, R (2013) EGFR mutation testing in lung cancer: a review of available methods and their use for analysis of tumour tissue and cytology samples. *J Clin Pathol* 66:79-89.

Engelman, J.A. (2009) Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 9:550-562.

Engelman, J.A., Zejnullahu, K, Mitsudomi, T, Song, Y, Hyland, C, Park, J.O, Lindeman, N, Gale, C, Zhao, X, Christensen, J, Kosaka, T, Holmes, A.J, Rogers, A.M, Cappuzzo, F, Mok, T, Lee, C, Johnson, B.E, Cantley, L.C, Janne, P.A (2007) MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316:1039-1043.

Fan, J., Wang, L, Jiang, G Gao, W (2012) Sublobectomy versus lobectomy for stage I non-small-cell lung cancer, a meta-analysis of published studies. *Ann Surg Oncol* 19:661-668.

Finberg, K.E., Sequist, L.V, Joshi, V.A, Muzikansky, A, Miller, J.M, Han, M, Beheshti, J, Chirieac, L.R, Mark, E.J Iafrate, A.J (2007) Mucinous differentiation correlates with absence of EGFR mutation and presence of KRAS mutation in lung adenocarcinomas with bronchioloalveolar features. *J Mol Diagn* 9:320-326.

Frederick, B.A., Helfrich, B.A, Coldren, C.D, Zheng, D, Chan, D, Bunn, P.A.J Raben, D (2007) Epithelial to mesenchymal transition predicts gefitinib resistance in cell lines of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung carcinoma. *Mol Cancer Ther* 6:1683-1691.

Fridman, W.H., Pagès, F, Sautès-Fridman, C Galon, J (2012) The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 12:298-306.

Fukuoka, M., Wu, Y, Thongprasert, S, Sunpaweravong, P, Leong, S, Sriuranpong, V, Chao, T, Nakagawa, K, Chu, D, Saijo, N, Duffield, E.L, Rukazenzov, Y, Speake, G, Jiang, H, Armour, A.A, To, K, Yang, J.C Mok, T.S.K (2011) Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J Clin Oncol* 29:2866-2874.

Fulda, S. (2010) Cell death and survival signaling in oncogenesis. *Klin Padiatr* 222:340-344.

Gabrilovich, D. (2004) Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* 4:941-952.

Gajra, A., Newman, N, Gamble, G.P, Kohman, L.J Graziano, S.L (2003) Effect of number of lymph nodes sampled on outcome in patients with stage I non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 21:1029-1034.

Galon, J., Costes, A, Sanchez-Cabo, F, Kirilovsky, A, Mlecnik, B, Lagorce-Pagès, C, Tosolini, M, Camus, M, Berger, A, Wind, P, Zinzindohoué, F, Bruneval, P, Cugnenc, P, Trajanoski, Z, Fridman, W Pagès, F (2006) Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313:1960-1964.

Galon, J., Pagès, F, Marincola, F.M, Angell, H.K, Thurin, M, Lugli, A, Zlobec, I, Berger, A, Bifulco, C, Botti, G, Tatangelo, F, Britten, C.M, Kreiter, S, Chouchane, L, Delrio, P, Arndt, H, Asslaber, M, Maio, M, Masucci, G.V, Mihm, M, Vidal-Vanaclocha, F, Allison, J.P, Gnjjatic, S, Hakansson, L, Huber, C, Singh-Jasuja, H, Ottensmeier, C, Zwierzina, H, Laghi, L, Grizzi, F, Ohashi, P.S, Shaw, P.A, Clarke, B.A, Wouters, B.G, Kawakami, Y, Hazama, S, Okuno, K, Wang, E, O'Donnell-Tormey, J, Lagorce, C, Pawelec, G, Nishimura, M.I, Hawkins, R, Lapointe, R, Lundqvist, A, Khleif, S.N, Ogino, S, Gibbs, P, Waring, P, Sato, N, Torigoe, T, Itoh, K, Patel, P.S, Shukla, S.N, Palmqvist, R, Nagtegaal, I.D, Wang, Y, D'Arrigo, C, Kopetz, S, Sinicrope, F.A, Trinchieri, G, Gajewski, T.F, Ascierto, P.A Fox, B.A (2012) Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med* 10:205.

- Galon, J., Pagès, F, Marincola, F.M, Thurin, M, Trinchieri, G, Fox, B.A, Gajewski, T.F Ascierto, P.A (2012) The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J Transl Med* 10:1.
- Gandini, S., Botteri, E, Iodice, S, Boniol, M, Lowenfels, A.B, Maisonneuve, P Boyle, P (2008) Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer* 122:155-164.
- Gao, B., Sun, Y, Zhang, J, Ren, Y, Fang, R, Han, X, Shen, L, Liu, X, Pao, W, Chen, H Ji, H (2010) Spectrum of LKB1, EGFR, and KRAS mutations in chinese lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol* 5:1130-1135.
- Gao, Q., Qiu, S, Fan, J, Zhou, J, Wang, X, Xiao, Y, Xu, Y, Li, Y Tang, Z (2007) Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol* 25:2586-2593.
- Garrido, P., González-Larriba, J.L, Insa, A, Provencio, M, Torres, A, Isla, D, Sanchez, J.M, Cardenal, F, Domine, M, Barcelo, J.R, Tarrazona, V, Varela, A, Aguiló, R, Astudillo, J, Muguruza, I, Artal, A, Hernando-Trancho, F, Massuti, B, Sanchez-Ronco, M Rosell, R (2007) Long-term survival associated with complete resection after induction chemotherapy in stage IIIA (N2) and IIIB (T4N0-1) non small-cell lung cancer patients: the Spanish Lung Cancer Group Trial 9901. *J Clin Oncol* 25:4736-4742.
- Gautschi, O., Pauli, C, Strobel, K, Hirschmann, A, Printzen, G, Aebi, S Diebold, J (2012) A patient with BRAF V600E lung adenocarcinoma responding to vemurafenib. *J Thorac Oncol* 7:e23-4.
- Gazdar, A.F. (2009) Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 28 Suppl 1:S24-31.
- Gazdar, A.F. (2009) Personalized medicine and inhibition of EGFR signaling in lung cancer. *N Engl J Med* 361:1018-1020.
- Gazdar, A.F. Brambilla, E (2010) Preneoplasia of lung cancer. *Cancer Biomark* 9:385-396.
- Gerdes, C.A., Nicolini, V.G, Herter, S, van Puijenbroek, E, Lang, S, Roemmele, M, Moessner, E, Freytag, O, Friess, T, Ries, C.H, Bossenmaier, B, Mueller, H.J Umaña, P (2013) GA201 (RG7160): a novel, humanized, glycoengineered anti-EGFR antibody with enhanced ADCC and superior in vivo efficacy compared with cetuximab. *Clin Cancer Res* 19:1126-1138.
- Gerlinger, M., Rowan, A.J, Horswell, S, Larkin, J, Endesfelder, D, Gronroos, E, Martinez, P, Matthews, N, Stewart, A, Tarpey, P, Varela, I, Phillimore, B, Begum, S, McDonald, N.Q, Butler, A, Jones, D, Raine, K, Latimer, C, Santos, C.R, Nohadani, M, Eklund, A.C, Spencer-Dene, B, Clark, G, Pickering, L, Stamp, G, Gore, M, Szallasi, Z, Downward, J, Futreal, P.A Swanton, C (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 366:883-892.

Germain, C., Gnjatic, S, Tamzalit, F, Knockaert, S, Remark, R, Goc, J, Lepelley, A, Becht, E, Katsahian, S, Bizouard, G, Validire, P, Damotte, D, Alifano, M, Magdeleinat, P, Cremer, I, Teillaud, J, Fridman, W, Sautès-Fridman, C Dieu-Nosjean, M (2014) Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 189:832-844.

Germain, R.N. (1994) MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76:287-299.

Ghiringhelli, F., Larmonier, N, Schmitt, E, Parcellier, A, Cathelin, D, Garrido, C, Chauffert, B, Solary, E, Bonnotte, B Martin, F (2004) CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* 34:336-344.

Gkogkou C, Frangia K, Saif MW, Trigidou R, Syrigos K. (2014). Necrosis and apoptotic index as prognostic factors in non-small cell lung carcinoma: a review. *Springerplus*. 2014 Mar 1;3:120.

Go, H., Jeon, Y.K, Park, H.J, Sung, S, Seo, J Chung, D.H (2010) High MET gene copy number leads to shorter survival in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 5:305-313.

Goc, J., Germain, C, Vo-Bourgais, T.K.D, Lupo, A, Klein, C, Knockaert, S, de Chaisemartin, L, Ouakrim, H, Becht, E, Alifano, M, Validire, P, Remark, R, Hammond, S.A, Cremer, I, Damotte, D, Fridman, W, Sautès-Fridman, C Dieu-Nosjean, M (2014) Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Res* 74:705-715.

Goldstraw, P., Crowley, J, Chansky, K, Giroux, D.J, Groome, P.A, Rami-Porta, R, Postmus, P.E, Rusch, V, Sobin, L, (2007) The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2:706-714.

Gonzalez Barcala, F.J., Garcia Prim, J.M, Moldes Rodriguez, M, Alvarez Fernandez, J, Rey Rey, M.J, Pose Reino, A Valdes Cuadrado, L (2010) Platelet count: association with prognosis in lung cancer. *Med Oncol* 27:357-362.

Goto, K., Satouchi, M, Ishii, G, Nishio, K, Hagiwara, K, Mitsudomi, T, Whiteley, J, Donald, E, McCormack, R Todo, T (2012) An evaluation study of EGFR mutation tests utilized for non-small-cell lung cancer in the diagnostic setting. *Ann Oncol* 23:2914-2919.

Govindan R, Ding L, Griffith M, Subramanian J, Dees ND, Kanchi KL, Maher CA, Fulton R, Fulton L, Wallis J, Chen K, Walker J, McDonald S, Bose R, Ornitz D, Xiong D, You M, Dooling DJ, Watson M, Mardis ER, Wilson RK. (2012). Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell*. 14;150(6):1121-34.

Graham, D.M. Appelman, H.D (1990) Crohn's-like lymphoid reaction and colorectal carcinoma: a potential histologic prognosticator. *Mod Pathol* 3:332-335.

Graziano, S.L. (1997) Non-small cell lung cancer: clinical value of new biological predictors. *Lung Cancer* 17 Suppl 1:S37-58.

Graziano, S.L., Gamble, G.P, Newman, N.B, Abbott, L.Z, Rooney, M, Mookherjee, S, Lamb, M.L, Kohman, L.J Poiesz, B.J (1999) Prognostic significance of K-ras codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 17:668-675.

Greenson, J.K., Huang, S, Herron, C, Moreno, V, Bonner, J.D, Tomsho, L.P, Ben-Izhak, O, Cohen, H.I, Trougouboff, P, Bejhar, J, Sova, Y, Pinchev, M, Rennert, G Gruber, S.B (2009) Pathologic predictors of microsatellite instability in colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 33:126-133.

Gridelli, C., Peters, S, Sgambato, A, Casaluca, F, Adjei, A.A Ciardiello, F (2013) ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC. *Cancer Treat Rev* 2:300-6.

Grob, T.J., Hoenig, T, Clauditz, T.S, Atanackovic, D, Koenig, A.M, Vashist, Y.K, Klose, H, Simon, R, Pantel, K, Izbicki, J.R, Bokemeyer, C, Sauter, G Wilczak, W (2013) Frequent intratumoral heterogeneity of EGFR gene copy gain in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 79:221-227.

Grégoire, C., Chasson, L, Luci, C, Tomasello, E, Geissmann, F, Vivier, E Walzer, T (2007) The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* 220:169-182.

Gu, J., Lu, C, Guo, J, Chen, L, Chu, Y, Ji, Y Ge, D (2013) Prognostic significance of the IASLC/ATS/ERS classification in Chinese patients-A single institution retrospective study of 292 lung adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 107:474-480.

Guix, M., Faber, A.C, Wang, S.E, Olivares, M.G, Song, Y, Qu, S, Rinehart, C, Seidel, B, Yee, D, Arteaga, C.L Engelman, J.A (2008) Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of IGF-binding proteins. *J Clin Invest* 118:2609-2619.

Hanahan, D. Weinberg, R.A (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.

Hanahan, D. Weinberg, R.A (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674.

Harvey. (1964) An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature* 204:1104-1105.

Halama, N., Michel, S, Kloor, M, Zoernig, I, Pommerenke, T, von Knebel Doeberitz, M, Schirmacher, P, Weitz, J, Grabe, N Jäger, D (2009) The localization and density of immune cells in primary tumors of human metastatic colorectal cancer shows an association with response to chemotherapy. *Cancer Immun* 19;9:1.

Harada, M., Hato, T Horio, H (2011) Intratumoral lymphatic vessel involvement is an invasive indicator of completely resected pathologic stage I non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 6:48-54.

He, M., Capelletti, M, Nafa, K, Yun, C, Arcila, M.E, Miller, V.A, Ginsberg, M.S, Zhao, B, Kris, M.G, Eck, M.J, Jänne, P.A, Ladanyi, M Oxnard, G.R (2012) EGFR exon 19 insertions: a new family of sensitizing EGFR mutations in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 18:1790-1797.

Heinmöller, P., Gross, C, Beyser, K, Schmidtgen, C, Maass, G, Pedrocchi, M Rüschoff, J (2003) HER2 status in non-small cell lung cancer: results from patient screening for enrollment to a phase II study of herceptin. *Clin Cancer Res* 9:5238-5243.

Herberman, R.B., Nunn, M.E, Holden, H.T Lavrin, D.H (1975) Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer* 16:230-239.

Herbst, R.S., Heymach, J.V Lippman, S.M (2008) Lung cancer. *N Engl J Med* 359:1367-1380.

Hirsch, F.R., Herbst, R.S, Olsen, C, Chansky, K, Crowley, J, Kelly, K, Franklin, W.A, Bunn, P.A.J, Varella-Garcia, M Gandara, D.R (2008) Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridization predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy. *J Clin Oncol* 26:3351-3357.

Hirsch, F.R., Varella-Garcia, M, Bunn, P.A.J, Franklin, W.A, Dziadziuszko, R, Thatcher, N, Chang, A, Parikh, P, Pereira, J.R, Ciuleanu, T, von Pawel, J, Watkins, C, Flannery, A, Ellison, G, Donald, E, Knight, L, Parums, D, Botwood, N Holloway, B (2006) Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 24:5034-5042.

Hirsch, F.R., Varella-Garcia, M, McCoy, J, West, H, Xavier, A.C, Gumerlock, P, Bunn, P.A.J, Franklin, W.A, Crowley, J, Gandara, D.R (2005) Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 23:6838-6845.

Hirsch, F.R., Varella-Garcia, M, Bunn, P.A.J, Di Maria, M.V, Veve, R, Bremmes, R.M, Barón, A.E, Zeng, C Franklin, W.A (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.

Hirsch, F.R., Varella-Garcia, M, Franklin, W.A, Veve, R, Chen, L, Helfrich, B, Zeng, C, Baron, A Bunn, P.A.J (2002) Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 86:1449-1456.

Hogg, J.C., Chu, F, Utokaparch, S, Woods, R, Elliott, W.M, Buzatu, L, Cherniack, R.M, Rogers, R.M, Sciurba, F.C, Coxson, H.O Paré, P.D (2004) The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 350:2645-2653.

Hollenbeak, C.S., Todd, M.M, Billingsley, E.M, Harper, G, Dyer, A Lengerich, E.J (2005) Increased incidence of melanoma in renal transplantation recipients. *Cancer* 104:1962-1967.

Honda, Y., Takigawa, N, Fushimi, S, Ochi, N, Kubo, T, Ozaki, S, Tanimoto, M Kiura, K (2012) Disappearance of an activated EGFR mutation after treatment with EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Lung Cancer* 78:121-124.

Horn, L. Pao, W (2009) EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 27:4232-4235.

Horn, L., Koehler, E, Gilbert, J Johnson, D.H (2011) Factors associated with the career choices of hematology and medical oncology fellows trained at academic institutions in the United States. *J Clin Oncol* 29:3932-3938.

Hornychova, H., Melichar, B, Tomsova, M, Mergancova, J, Urmanska, H Ryska, A (2008) Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast carcinoma. *Cancer Invest* 26:1024-1031.

Hotta, K., Sho, M, Fujimoto, K, Shimada, K, Yamato, I, Anai, S, Konishi, N, Hirao, Y, Nonomura, K Nakajima, Y (2011) Prognostic significance of CD45RO+ memory T cells in renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 105:1191-1196.

Huang, S., Armstrong, E.A, Benavente, S, Chinnaiyan, P Harari, P.M (2004) Dual-agent molecular targeting of the epidermal growth factor receptor (EGFR): combining anti-EGFR antibody with tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Res* 64:5355-5362.

Huncharek, M., Muscat, J Geschwind, J.F (1999) K-ras oncogene mutation as a prognostic marker in non-small cell lung cancer: a combined analysis of 881 cases. *Carcinogenesis* 20:1507-1510.

Hunt, J.D., Strimas, A, Martin, J.E, Eyer, M, Haddican, M, Lockett, B.G, Ruiz, B, Axelrad, T.W, Backes, W.L Fontham, E.T.H (2002) Differences in KRAS mutation spectrum in lung cancer cases between African Americans and Caucasians after occupational or environmental exposure to known carcinogens. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:1405-1412.

Husain, A.N., Colby, T.V, Ordóñez, N.G, Krausz, T, Borczuk, A, Cagle, P.T, Chirieac, L.R, Churg, A, Galateau-Salle, F, Gibbs, A.R, Gown, A.M, Hammar, S.P, Litzky, L.A, Roggli, V.L, Travis, W.D Wick, M.R (2009) Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma: a consensus statement from the International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol Lab Med* 133:1317-1331.

Ikeda, K., Nomori, H, Mori, T, Sasaki, J Kobayashi, T (2008) Novel germline mutation: EGFR V843I in patient with multiple lung adenocarcinomas and family members with lung cancer. *Ann Thorac Surg* 85:1430-1432.

Inamura, K., Takeuchi, K, Togashi, Y, Hatano, S, Ninomiya, H, Motoi, N, Mun, M, Sakao, Y, Okumura, S, Nakagawa, K, Soda, M, Choi, Y.L, Mano, H Ishikawa, Y (2009) EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Mod Pathol* 22:508-515.

Inamura, K., Takeuchi, K, Togashi, Y, Nomura, K, Ninomiya, H, Okui, M, Satoh, Y, Okumura, S, Nakagawa, K, Soda, M, Choi, Y.L, Niki, T, Mano, H Ishikawa, Y (2008)

EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. *J Thorac Oncol* 3:13-17.

Inoue M, Takakuwa T, Minami M, Shiono H, Utsumi T, Kadota Y, Nasu T, Aozasa K, Okumura M. Clinicopathologic factors influencing postoperative prognosis in patients with small-sized adenocarcinoma of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008;135:830–836.

Inukai, M., Toyooka, S, Ito, S, Asano, H, Ichihara, S, Soh, J, Suehisa, H, Ouchida, M, Aoe, K, Aoe, M, Kiura, K, Shimizu, N Date, H (2006) Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 66:7854-7858.

Ito, N., Suzuki, Y, Taniguchi, Y, Ishiguro, K, Nakamura, H Ohgi, S (2005) Prognostic significance of T helper 1 and 2 and T cytotoxic 1 and 2 cells in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 25:2027-2031.

Iyoda, A., Hiroshima, K, Toyozaki, T, Haga, Y, Fujisawa, T Ohwada, H (2001) Clinical characterization of pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma and large cell carcinoma with neuroendocrine morphology. *Cancer* 91:1992-2000.

Izar, B., Sequist, L, Lee, M, Muzikansky, A, Heist, R, Iafrate, J, Dias-Santagata, D, Mathisen, D Lanuti, M (2013) The impact of EGFR mutation status on outcomes in patients with resected stage I non-small cell lung cancers. *Ann Thorac Surg* 96:962-968.

Jackman, D., Pao, W, Riely, G.J, Engelman, J.A, Kris, M.G, Jänne, P.A, Lynch, T, Johnson, B.E Miller, V.A (2010) Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 28:357-360.

Jakobsen, J.N. Sørensen, J.B (2012) Intratumor heterogeneity and chemotherapy-induced changes in EGFR status in non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 69:289-299.

Janjigian, Y.Y., Azzoli, C.G, Krug, L.M, Pereira, L.K, Rizvi, N.A, Pietanza, M.C, Kris, M.G, Ginsberg, M.S, Pao, W, Miller, V.A Riely, G.J (2011) Phase I/II trial of cetuximab and erlotinib in patients with lung adenocarcinoma and acquired resistance to erlotinib. *Clin Cancer Res* 17:2521-2527.

Jänne, P.A., Shaw, A.T, Pereira, J.R, Jeannin, G, Vansteenkiste, J, Barrios, C, Franke, F.A, Grinsted, L, Zazulina, V, Smith, P, Smith, I Crinò, L (2013) Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol* 14:38-47.

Jass, J.R. (1986) Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J Clin Pathol* 39:585-589.

Jemal, A., Bray, F, Center, M.M, Ferlay, J, Ward, E Forman, D (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69-90.

Ji, H., Zhao, X, Yuza, Y, Shimamura, T, Li, D, Protopopov, A, Jung, B.L, McNamara, K, Xia, H, Glatt, K.A, Thomas, R.K, Sasaki, H, Horner, J.W, Eck, M, Mitchell, A, Sun, Y, Al-

Hashem, R, Bronson, R.T, Rabindran, S.K, Discafani, C.M, Maher, E, Shapiro, G.I, Meyerson, M Wong, K (2006) Epidermal growth factor receptor variant III mutations in lung tumorigenesis and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7817-7822.

Jiang, S., Yamashita, K, Yamamoto, M, Piao, C, Umezawa, A, Saegusa, M, Yoshida, T, Katagiri, M, Masuda, N, Hayakawa, K Okayasu, I (2008) EGFR genetic heterogeneity of nonsmall cell lung cancers contributing to acquired gefitinib resistance. *Int J Cancer* 123:2480-2486.

John, T., Liu, G Tsao, M (2009) Overview of molecular testing in non-small-cell lung cancer: mutational analysis, gene copy number, protein expression and other biomarkers of EGFR for the prediction of response to tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 28 Suppl 1:S14-23.

Johnson, B.E. Jänne, P.A (2005) Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 65:7525-7529.

Johnson, D.H., Fehrenbacher, L, Novotny, W.F, Herbst, R.S, Nemunaitis, J.J, Jablons, D.M, Langer, C.J, DeVore, R.F.3, Gaudreault, J, Damico, L.A, Holmgren, E Kabbinavar, F (2004) Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 22:2184-2191.

Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, Bronson RT, Crowley D, Tuveson DA, Jacks T. (2001) Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature*. 26;410(6832):1111-6.

Johnson, M.L., Sima, C.S, Chaft, J, Paik, P.K, Pao, W, Kris, M.G, Ladanyi, M Riely, G.J (2013) Association of KRAS and EGFR mutations with survival in patients with advanced lung adenocarcinomas. *Cancer* 119:356-362.

Joyce, J.A. Pollard, J.W (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9:239-252.

Junker, K., Langner, K, Klinke, F, Bosse, U Thomas, M (2001) Grading of tumor regression in non-small cell lung cancer : morphology and prognosis. *Chest* 120:1584-1591.

Kadota, K., Suzuki, K, Kachala, S.S, Zabor, E.C, Sima, C.S, Moreira, A.L, Yoshizawa, A, Riely, G.J, Rusch, V.W, Adusumilli, P.S Travis, W.D (2012) A grading system combining architectural features and mitotic count predicts recurrence in stage I lung adenocarcinoma. *Mod Pathol* 25:1117-1127.

Kadota, K., Yeh, Y, Sima, C.S, Rusch, V.W, Moreira, A.L, Adusumilli, P.S Travis, W.D (2013) The cribriform pattern identifies a subset of acinar predominant tumors with poor prognosis in patients with stage I lung adenocarcinoma: a conceptual proposal to classify cribriform predominant tumors as a distinct histologic subtype. *Mod Pathol* 5:690-700.

Katayama, R., Shaw, A.T, Khan, T.M, Mino-Kenudson, M, Solomon, B.J, Halmos, B, Jessop, N.A, Wain, J.C, Yeo, A.T, Benes, C, Drew, L, Saeh, J.C, Crosby, K, Sequist, L.V, Iafrate, A.J

- Engelman, J.A (2012) Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. *Sci Transl Med* 4:120ra17.
- Keohavong, P., DeMichele, M.A, Melacrinis, A.C, Landreneau, R.J, Weyant, R.J Siegfried, J.M (1996) Detection of K-ras mutations in lung carcinomas: relationship to prognosis. *Clin Cancer Res* 2:411-418.
- Kiliçgün A, Turna A, Sayar A, Solak O, Urer N, Gürses A. Very important histopathological factors in patients with resected non-small cell lung cancer: necrosis and perineural invasion. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2010;58:93–97.
- Kim, Y.T., Seong, Y.W, Jung, Y.J, Jeon, Y.K, Park, I.K, Kang, C.H Kim, J.H (2013) The presence of mutations in epidermal growth factor receptor gene is not a prognostic factor for long-term outcome after surgical resection of non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 8:171-178.
- Kimura, E.T., Nikiforova, M.N, Zhu, Z, Knauf, J.A, Nikiforov, Y.E Fagin, J.A (2003) High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 63:1454-1457.
- Kirsten, W.H. Mayer, L.A (1967) Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J Natl Cancer Inst* 39:311-335.
- Kobayashi, K. Hagiwara, K (2013) Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation and personalized therapy in advanced nonsmall cell lung cancer (NSCLC). *Target Oncol* 8:27-33.
- Kobayashi, S., Boggon, T.J, Dayaram, T, Jänne, P.A, Kocher, O, Meyerson, M, Johnson, B.E, Eck, M.J, Tenen, D.G Halmos, B (2005) EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 352:786-792.
- Koivunen, J.P., Mermel, C, Zejnullahu, K, Murphy, C, Lifshits, E, Holmes, A.J, Choi, H.G, Kim, J, Chiang, D, Thomas, R, Lee, J, Richards, W.G, Sugarbaker, D.J, Ducko, C, Lindeman, N, Marcoux, J.P, Engelman, J.A, Gray, N.S, Lee, C, Meyerson, M Jänne, P.A (2008) EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res* 14:4275-4283.
- Kolbeck, P.C., Kaveggia, F.F, Johansson, S.L, Grune, M.T Taylor, R.J (1992) The relationships among tumor-infiltrating lymphocytes, histopathologic findings, and long-term clinical follow-up in renal cell carcinoma. *Mod Pathol* 5:420-425.
- Kondratiev, S., Sabo, E, Yakirevich, E, Lavie, O Resnick, M.B (2004) Intratumoral CD8+ T lymphocytes as a prognostic factor of survival in endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res* 10:4450-4456.
- Krasinskas AM, Chiosea SI, Pal T, Dacic S. (2014). KRAS mutational analysis and immunohistochemical studies can help distinguish pancreatic metastases from primary lung adenocarcinomas. *Mod Pathol.*27(2):262-70.

Kudo, Y., Saji, H, Shimada, Y, Matsubayashi, J, Nagao, T, Kakihana, M, Usuda, J, Kajiwara, N, Ohira, T Ikeda, N (2013) Proposal on incorporating blood vessel invasion into the T classification parts as a practical staging system for stage I non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 81:187-193.

Kwak, E.L., Bang, Y, Camidge, D.R, Shaw, A.T, Solomon, B, Maki, R.G, Ou, S.I, Dezube, B.J, Jänne, P.A, Costa, D.B, Varella-Garcia, M, Kim, W, Lynch, T.J, Fidias, P, Stubbs, H, Engelman, J.A, Sequist, L.V, Tan, W, Gandhi, L, Mino-Kenudson, M, Wei, G.C, Shreeve, S.M, Ratain, M.J, Settleman, J, Christensen, J.G, Haber, D.A, Wilner, K, Salgia, R, Shapiro, G.I, Clark, J.W Iafrate, A.J (2010) Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 363:1693-1703.

Lacroix, L., Besse, B, Bidart, J Bosq, J (2009) [KRAS status versus EGFR status in lung cancer therapy]. *Bull Cancer* 96 Suppl:S75-83.

Ladanyi, M. Pao, W (2008) Lung adenocarcinoma: guiding EGFR-targeted therapy and beyond. *Mod Pathol* 21 Suppl 2:S16-22.

Ladányi, A., Kiss, J, Somlai, B, Gilde, K, Fejos, Z, Mohos, A, Gaudi, I Tímár, J (2007) Density of DC-LAMP(+) mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. *Cancer Immunol Immunother* 56:1459-1469.

Ladoire S, Mignot G, Dabakuyo S, Arnould L, Apetoh L, Rébé C, Coudert B, Martin F, Bizollon MH, Vanoli A, Coutant C, Fumoleau P, Bonnetain F, Ghiringhelli F. (2011). In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival. *J Pathol.*224(3):389-400.

Lau, S.K., Luthringer, D.J Eisen, R.N (2002) Thyroid transcription factor-1: a review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 10:97-102.

Lee, K., Chapman, R.S, Shen, M, Lubin, J.H, Silverman, D.T, He, X, Hosgood, H.D.3, Chen, B.E, Rajaraman, P, Caporaso, N.E, Fraumeni, J.F.J, Blair, A Lan, Q (2010) Differential effects of smoking on lung cancer mortality before and after household stove improvement in Xuanwei, China. *Br J Cancer* 103:727-729.

Lee HY, Lee HJ, Kim YT, et al. Value of combined interpretation of computed tomography response and positron emission tomography response for prediction of prognosis after neoadjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2010; 5:497–503.

Le Faou, A., Scemama, O, Ruelland, A Ménard, J (2005) [Characteristics of smokers seeking smoking cessation services: the CDT programme]. *Rev Mal Respir* 22:739-750.

Lepelletier Y, Smaniotto S, Hadj-Slimane R, Villa-Verde DM, Nogueira AC, Dardenne M, Hermine O, Savino W (2007) Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(13):5545–5550.

Li, A.R., Chitale, D, Riely, G.J, Pao, W, Miller, V.A, Zakowski, M.F, Rusch, V, Kris, M.G Ladanyi, M (2008) EGFR mutations in lung adenocarcinomas: clinical testing experience and

relationship to EGFR gene copy number and immunohistochemical expression. *J Mol Diagn* 10:242-248.

Li, H., Pan, Y, Li, Y, Li, C, Wang, R, Hu, H, Zhang, Y, Ye, T, Wang, L, Shen, L, Sun, Y, Chen, H (2013) Frequency of well-identified oncogenic driver mutations in lung adenocarcinoma of smokers varies with histological subtypes and graduated smoking dose. *Lung Cancer* 79:8-13.

Li, X., Hisaoka, M, Shi, D, Zhu, X Hashimoto, H (2004) Expression of anaplastic lymphoma kinase in soft tissue tumors: an immunohistochemical and molecular study of 249 cases. *Hum Pathol* 35:711-721.

Liu, W., Zhao, L, Pang, Q, Yuan, Z, Li, B Wang, P (2014) Prognostic value of epidermal growth factor receptor mutations in resected lung adenocarcinomas. *Med Oncol* 31:771.

Liu-Jarin, X., Stoopler, M.B, Raftopoulos, H, Ginsburg, M, Gorenstein, L Borczuk, A.C (2003) Histologic assessment of non-small cell lung carcinoma after neoadjuvant therapy. *Mod Pathol* 16:1102-1108.

Lu, C., Soria, J, Tang, X, Xu, X, Wang, L, Mao, L, Lotan, R, Kemp, B, Bekele, B.N, Feng, L, Hong, W.K Khuri, F.R (2004) Prognostic factors in resected stage I non-small-cell lung cancer: a multivariate analysis of six molecular markers. *J Clin Oncol* 22:4575-4583.

Lurje, G. Lenz, H (2009) EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* 77:400-410.

Lynch, T.J., Bondarenko, I, Luft, A, Serwatowski, P, Barlesi, F, Chacko, R, Sebastian, M, Neal, J, Lu, H, Cuillerot, J Reck, M (2012) Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase II study. *J Clin Oncol* 30:2046-2054.

Lynch, T.J., Bell, D.W, Sordella, R, Gurubhagavatula, S, Okimoto, R.A, Brannigan, B.W, Harris, P.L, Haserlat, S.M, Supko, J.G, Haluska, F.G, Louis, D.N, Christiani, D.C, Settleman, J Haber, D.A (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.

Ma X, Vataire AL, Sun H, et al. TP53 AND KRAS Mutations as markers of outcome of adjuvant cisplatin-based chemotherapy in completely resected non-small cell lung cancer (NSCLC): The International Adjuvant Lung Cancer Trial (IALT) biological program. *Annal Oncol* 2008;19(Suppl 8):viii61.

Ma, C., Wei, S Song, Y (2011) T790M and acquired resistance of EGFR TKI: a literature review of clinical reports. *J Thorac Dis* 3:10-18.

MacKie, R.M., Reid, R Junor, B (2003) Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *N Engl J Med* 348:567-568.

Mackensen, A., Carcelain, G, Viel, S, Raynal, M.C, Michalaki, H, Triebel, F, Bosq, J Hercend, T (1994) Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma. *J Clin Invest* 93:1397-1402.

Maeda, R., Yoshida, J, Ishii, G, Hishida, T, Nishimura, M Nagai, K (2011) Risk factors for tumor recurrence in patients with early-stage (stage I and II) non-small cell lung cancer: patient selection criteria for adjuvant chemotherapy according to the seventh edition TNM classification. *Chest* 140:1494-1502.

Mahmoud, S.M.A., Paish, E.C, Powe, D.G, Macmillan, R.D, Grainge, M.J, Lee, A.H.S, Ellis, I.O Green, A.R (2011) Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 29:1949-1955.

Mansuet-Lupo, A., Bobbio, A, Blons, H, Becht, E, Ouakrim, H, Didelot, A, Charpentier, M, Bain, S, Marmey, B, Bonjour, P, Biton, J, Cremer, I, Dieu-Nosjean, M, Sautès-Fridman, C, Régnard, J, Laurent-Puig, P, Alifano, M Damotte, D (2014) The new histological classification of lung primary adenocarcinoma subtypes is a reliable prognostic marker and identifies tumors with different mutation status: the experience of a French cohort. *Chest*.

Marchetti, A., Buttitta, F, Pellegrini, S, Chella, A, Bertacca, G, Filardo, A, Tognoni, V, Ferreli, F, Signorini, E, Angeletti, C.A Bevilacqua, G (1996) Bronchioloalveolar lung carcinomas: K-ras mutations are constant events in the mucinous subtype. *J Pathol* 179:254-259.

Marchetti, A., Martella, C, Felicioni, L, Barassi, F, Salvatore, S, Chella, A, Campese, P.P, 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.

Marchetti, A., Ardizzoni, A, Papotti, M, Crinò, L, Rossi, G, Gridelli, C, Barberis, M, Maiorano, E, Normanno, N, Taddei, G.L, Scagliotti, G, Clemente, C Pinto, C (2013) Recommendations for the analysis of ALK gene rearrangements in non-small-cell lung cancer: a consensus of the Italian Association of Medical Oncology and the Italian Society of Pathology and Cytopathology. *J Thorac Oncol* 8:352-358.

Martelli, M.P., Sozzi, G, Hernandez, L, Pettirossi, V, Navarro, A, Conte, D, Gasparini, P, Perrone, F, Modena, P, Pastorino, U, Carbone, A, Fabbri, A, Sidoni, A, Nakamura, S, Gambacorta, M, Fernández, P.L, Ramirez, J, Chan, J.K.C, Grigioni, W.F, Campo, E, Pileri, S.A Falini, B (2009) EML4-ALK rearrangement in non-small cell lung cancer and non-tumor lung tissues. *Am J Pathol* 174:661-670.

Martin, J., Ginsberg, R.J, Venkatraman, E.S, Bains, M.S, Downey, R.J, Korst, R.J, Kris, M.G Rusch, V.W (2002) Long-term results of combined-modality therapy in resectable non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 20:1989-1995.

Martinet L, Garrido I, Filleron T, Le Guellec S, Bellard E, Fournie JJ, Rochaix P, Girard JP. (2011). Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* 1;71(17):5678-87.

- Martini, N. Melamed, M.R (1975) Multiple primary lung cancers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 70:606-612.
- Mascaux, C., Iannino, N, Martin, B, Paesmans, M, Berghmans, T, Dusart, M, Haller, A, Lothaire, P, Meert, A, Noel, S, Lafitte, J Sculier, J (2005) The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 92:131-139.
- Mazières, J., Peters, S, Lepage, B, Cortot, A.B, Barlesi, F, Beau-Faller, M, Besse, B, Blons, H, Mansuet-Lupo, A, Urban, T, Moro-Sibilot, D, Dansin, E, Chouaid, C, Wislez, M, Diebold, J, Felip, E, Rouquette, I, Milia, J.D Gautschi, O (2013) Lung cancer that harbors an HER2 mutation: epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives. *J Clin Oncol* 31:1997-2003.
- McKay, J.D., Hung, R.J, Gaborieau, V, Boffetta, P, Chabrier, A, Byrnes, G, Zaridze, D, Mukeria, A, Szeszenia-Dabrowska, N, Lissowska, J, Rudnai, P, Fabianova, E, Mates, D, Bencko, V, Foretova, L, Janout, V, McLaughlin, J, Shepherd, F, Montpetit, A, Narod, S, Krokan, H.E, Skorpen, F, Elvestad, M.B, Vatten, L, Njølstad, I, Axelsson, T, Chen, C, Goodman, G, Barnett, M, Loomis, M.M, Lubiński, J, Matyjasik, J, Lener, M, Oszutowska, D, Field, J, Liloglou, T, Xinarianos, G, Cassidy, A, Vineis, P, Clavel-Chapelon, F, Palli, D, Tumino, R, Krogh, V, Panico, S, González, C.A, Ramón Quirós, J, Martínez, C, Navarro, C, Ardanaz, E, Larrañaga, N, Kham, K.T, Key, T, Bueno-de-Mesquita, H.B, Peeters, P.H, Trichopoulou, A, Linseisen, J, Boeing, H, Hallmans, G, Overvad, K, Tjønneland, A, Kumle, M, Riboli, E, Zelenika, D, Boland, A, Delepine, M, Foglio, M, Lechner, D, Matsuda, F, Blanche, H, Gut, I, Heath, S, Lathrop, M Brennan, P (2008) Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33. *Nat Genet* 40:1404-1406.
- McLeer-Florin, A. Lantuéjoul, S (2012) Why technical aspects rather than biology explain cellular heterogeneity in ALK-positive non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis* 4:240-241.
- Meng, D., Yuan, M, Li, X, Chen, L, Yang, J, Zhao, X, Ma, W Xin, J (2013) Prognostic value of K-RAS mutations in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Lung Cancer* 81:1-10.
- Metro, G., Chiari, R, Duranti, S, Siggillino, A, Fischer, M.J, Giannarelli, D, Ludovini, V, Bennati, C, Marcomigni, L, Baldi, A, Giansanti, M, Minotti, V Crinò, L (2012) Impact of specific mutant KRAS on clinical outcome of EGFR-TKI-treated advanced non-small cell lung cancer patients with an EGFR wild type genotype. *Lung Cancer* 78:81-86.
- Michael-Robinson, J.M., Biemer-Hüttmann, A, Purdie, D.M, Walsh, M.D, Simms, L.A, Biden, K.G, Young, J.P, Leggett, B.A, Jass, J.R Radford-Smith, G.L (2001) Tumour infiltrating lymphocytes and apoptosis are independent features in colorectal cancer stratified according to microsatellite instability status. *Gut* 48:360-366.
- Miller, V.A., Hirsh, V, Cadranel, J, Chen, Y, Park, K, Kim, S, Zhou, C, Su, W, Wang, M, Sun, Y, Heo, D.S, Crino, L, Tan, E, Chao, T, Shahidi, M, Cong, X.J, Lorence, R.M Yang, J.C (2012) Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung

cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *Lancet Oncol* 13:528-538.

Miller, R.R. (1990) Bronchioloalveolar cell adenomas. *Am J Surg Pathol* 14:904-912.

Mino-Kenudson, M., Chirieac, L.R, Law, K, Hornick, J.L, Lindeman, N, Mark, E.J, Cohen, D.W, Johnson, B.E, Jänne, P.A, Iafrate, A.J Rodig, S.J (2010) A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin Cancer Res* 16:1561-1571.

Miossec, P. (2009) IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microbes Infect* 11:625-630.

Mlecnik, B., Tosolini, M, Kirilovsky, A, Berger, A, Bindea, G, Meatchi, T, Bruneval, P, Trajanoski, Z, Fridman, W, Pagès, F Galon, J (2011) Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol* 29:610-618.

Mok, T.S., Wu, Y, Thongprasert, S, Yang, C, Chu, D, Saijo, N, Sunpaweravong, P, Han, B, Margono, B, Ichinose, Y, Nishiwaki, Y, Ohe, Y, Yang, J, Chewaskulyong, B, Jiang, H, Duffield, E.L, Watkins, C.L, Armour, A.A Fukuoka, M (2009) Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 361:947-957.

Morandell, S., Stasyk, T, Skvortsov, S, Ascher, S Huber, L.A (2008) Quantitative proteomics and phosphoproteomics reveal novel insights into complexity and dynamics of the EGFR signaling network. *Proteomics* 8:4383-4401.

Morris, S.W., Kirstein, M.N, Valentine, M.B, Dittmer, K.G, Shapiro, D.N, Saltman, D.L Look, A.T (1994) Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 263:1281-1284.

Mosmann, T.R., Cherwinski, H, Bond, M.W, Giedlin, M.A Coffman, R.L (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348-2357.

Motoi, N., Szoke, J, Riely, G.J, Seshan, V.E, Kris, M.G, Rusch, V.W, Gerald, W.L Travis, W.D (2008) Lung adenocarcinoma: modification of the 2004 WHO mixed subtype to include the major histologic subtype suggests correlations between papillary and micropapillary adenocarcinoma subtypes, EGFR mutations and gene expression analysis. *Am J Surg Pathol* 32:810-827.

Mouillet, G., Monnet, E, Milleron, B, Puyraveau, M, Quoix, E, David, P, Ducoloné, A, Molinier, O, Zalcman, G, Depierre, A, Westeel, V (2012) Pathologic complete response to preoperative chemotherapy predicts cure in early-stage non-small-cell lung cancer: combined analysis of two IFCT randomized trials. *J Thorac Oncol* 7:841-849.

Moyron-Quiroz, J.E., Rangel-Moreno, J, Kusser, K, Hartson, L, Sprague, F, Goodrich, S, Woodland, D.L, Lund, F.E Randall, T.D (2004) Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nat Med* 10:927-934.

- Mu CY, Huang JA, Chen Y, Chen C, Zhang XG. (2011) High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med Oncol.*;28(3):682-8.
- Mullins, D.W., Burger, C.J Elgert, K.D (1999) Paclitaxel enhances macrophage IL-12 production in tumor-bearing hosts through nitric oxide. *J Immunol* 162:6811-6818.
- Naik JD, Seligmann J, Perren TJ.(2012). Mucinous tumours of the ovary. *J Clin Pathol.* 2012 Jul;65(7):580-4.
- Nakahara, R., Yokose, T, Nagai, K, Nishiwaki, Y Ochiai, A (2001) Atypical adenomatous hyperplasia of the lung: a clinicopathological study of 118 cases including cases with multiple atypical adenomatous hyperplasia. *Thorax* 56:302-305.
- Nakano, O., Sato, M, Naito, Y, Suzuki, K, Orikasa, S, Aizawa, M, Suzuki, Y, Shintaku, I, Nagura, H Ohtani, H (2001) Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res* 61:5132-5136.
- Nentwich, M.F., Bohn, B.A, Uzunoglu, F.G, Reeh, M, Quaas, A, Grob, T.J, Perez, D, Kutup, A, Bockhorn, M, Izbicki, J.R Vashist, Y.K (2013) Lymphatic invasion predicts survival in patients with early node-negative non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 146:781-787.
- Neyt, K., Perros, F, GeurtsvanKessel, C.H, Hammad, H Lambrecht, B.N (2012) Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity. *Trends Immunol* 33:297-305.
- Nicholson, A.G., Gonzalez, D, Shah, P, Pynegar, M.J, Deshmukh, M, Rice, A Popat, S (2010) Refining the diagnosis and EGFR status of non-small cell lung carcinoma in biopsy and cytologic material, using a panel of mucin staining, TTF-1, cytokeratin 5/6, and P63, and EGFR mutation analysis. *J Thorac Oncol* 5:436-441.
- Nicholson, R.I., Gee, J.M Harper, M.E (2001) EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4:S9-15.
- Nielsen, J.S. Nelson, B.H (2012) Tumor-infiltrating B cells and T cells: Working together to promote patient survival. *Oncoimmunology* 1:1623-1625.
- Ninomiya, H., Hiramatsu, M, Inamura, K, Nomura, K, Okui, M, Miyoshi, T, Okumura, S, Satoh, Y, Nakagawa, K, Nishio, M, Horai, T, Miyata, S, Tsuchiya, E, Fukayama, M Ishikawa, Y (2009) Correlation between morphology and EGFR mutations in lung adenocarcinomas Significance of the micropapillary pattern and the hobnail cell type. *Lung Cancer* 63:235-240.
- Nurieva, R.I. Chung, Y (2010) Understanding the development and function of T follicular helper cells. *Cell Mol Immunol* 7:190-197.
- Oberg, M., Jaakkola, M.S, Woodward, A, Peruga, A Prüss-Ustün, A (2011) Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. *Lancet* 377:139-146.

O'Byrne, K.J., Gatzemeier, U, Bondarenko, I, Barrios, C, Eschbach, C, Martens, U.M, Hotko, Y, Kortsik, C, Paz-Ares, L, Pereira, J.R, von Pawel, J, Ramlau, R, Roh, J, Yu, C, Stroh, C, Celik, I, Schueler, A Pirker, R (2011) Molecular biomarkers in non-small-cell lung cancer: a retrospective analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol* 12:795-805.

Ohashi, K., Sequist, L.V, Arcila, M.E, Moran, T, Chmielecki, J, Lin, Y, Pan, Y, Wang, L, de Stanchina, E, Shien, K, Aoe, K, Toyooka, S, Kiura, K, Fernandez-Cuesta, L, Fidias, P, Yang, J.C, Miller, V.A, Riely, G.J, Kris, M.G, Engelman, J.A, Vnencak-Jones, C.L, Dias-Santagata, D, Ladanyi, M Pao, W (2012) Lung cancers with acquired resistance to EGFR inhibitors occasionally harbor BRAF gene mutations but lack mutations in KRAS, NRAS, or MEK1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E2127-33.

Oxnard, G.R., Janjigian, Y.Y, Arcila, M.E, Sima, C.S, Kass, S.L, Riely, G.J, Pao, W, Kris, M.G, Ladanyi, M, Azzoli, C.G Miller, V.A (2011) Maintained sensitivity to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer recurring after adjuvant erlotinib or gefitinib. *Clin Cancer Res* 17:6322-6328.

Paez, J.G., Jänne, P.A, Lee, J.C, Tracy, S, Greulich, H, Gabriel, S, Herman, P, Kaye, F.J, Lindeman, N, Boggon, T.J, Naoki, K, Sasaki, H, Fujii, Y, Eck, M.J, Sellers, W.R, Johnson, B.E Meyerson, M (2004) EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304:1497-1500.

Pagès, F., Kirilovsky, A, Mlecnik, B, Asslaber, M, Tosolini, M, Bindea, G, Lagorce, C, Wind, P, Marliot, F, Bruneval, P, Zatloukal, K, Trajanoski, Z, Berger, A, Fridman, W Galon, J (2009) In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27:5944-5951.

Pagès, F., Berger, A, Camus, M, Sanchez-Cabo, F, Costes, A, Molidor, R, Mlecnik, B, Kirilovsky, A, Nilsson, M, Damotte, D, Meatchi, T, Bruneval, P, Cugnenc, P, Trajanoski, Z, Fridman, W Galon, J (2005) Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 353:2654-2666.

Paik, J.H., Choe, G, Kim, H, Choe, J, Lee, H.J, Lee, C, Lee, J.S, Jheon, S Chung, J (2011) Screening of anaplastic lymphoma kinase rearrangement by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer: correlation with fluorescence in situ hybridization. *J Thorac Oncol* 6:466-472.

Palucka, K. Banchereau, J (2012) Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* 12:265-277.

Pao, W. Girard, N (2011) New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 12:175-180.

Pao, W., Miller, V.A, Politi, K.A, Riely, G.J, Somwar, R, Zakowski, M.F, Kris, M.G 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., 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.

Park, J.O., Lee, S.I, Song, S.Y, Kim, K, Kim, W.S, Jung, C.W, Park, Y.S, Im, Y, Kang, W.K, Lee, M.H, Lee, K.S Park, K (2003) Measuring response in solid tumors: comparison of RECIST and WHO response criteria. *Jpn J Clin Oncol* 33:533-537.

Parsons, A., Daley, A, Begh, R Aveyard, P (2010) Influence of smoking cessation after diagnosis of early stage lung cancer on prognosis: systematic review of observational studies with meta-analysis. *BMJ* 340:b5569.

Pataer, A., Kalhor, N, Correa, A.M, Raso, M.G, Erasmus, J.J, Kim, E.S, Behrens, C, Lee, J.J, Roth, J.A, Stewart, D.J, Vaporciyan, A.A, Wistuba, I.I, Swisher, S.G (2012) Histopathologic response criteria predict survival of patients with resected lung cancer after neoadjuvant chemotherapy. *J Thorac Oncol* 7:825-832.

Pedersen, M.W., Meltorn, M, Damstrup, L Poulsen, H.S (2001) The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Ann Oncol* 12:745-760.

Pellegrini, C., Falleni, M, Marchetti, A, Cassani, B, Miozzo, M, Buttitta, F, Roncalli, M, Coggi, G Bosari, S (2003) HER-2/Neu alterations in non-small cell lung cancer: a comprehensive evaluation by real time reverse transcription-PCR, fluorescence in situ hybridization, and immunohistochemistry. *Clin Cancer Res* 9:3645-3652.

Peranzoni E, Rivas-Caicedo A, Bougherara H, Salmon H, Donnadieu E. (2013). Positive and negative influence of the matrix architecture on antitumor immune surveillance. *Cell Mol Life Sci.* 2013 Dec;70(23):4431-48.

Perera, S.A., Li, D, Shimamura, T, Raso, M.G, Ji, H, Chen, L, Borgman, C.L, Zaghlul, S, Brandstetter, K.A, Kubo, S, Takahashi, M, Chirieac, L.R, Padera, R.F, Bronson, R.T, Shapiro, G.I, Greulich, H, Meyerson, M, Guertler, U, Chesa, P.G, Solca, F, Wistuba, I.I Wong, K (2009) HER2YVMA drives rapid development of adenosquamous lung tumors in mice that are sensitive to BIBW2992 and rapamycin combination therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:474-479.

Pillay, K., Govender, D Chetty, R (2002) ALK protein expression in rhabdomyosarcomas. *Histopathology* 41:461-467.

Pines, G., Köstler, W.J Yarden, Y (2010) Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. *FEBS Lett* 584:2699-2706.

Pirker, R., Pereira, J.R, von Pawel, J, Krzakowski, M, Ramlau, R, Park, K, de Marinis, F, Eberhardt, W.E.E, Paz-Ares, L, Störkel, S, Schumacher, K, von Heydebreck, A, Celik, I O'Byrne, K.J (2012) EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol* 13:33-42.

Platonova, S., Cherfils-Vicini, J, Damotte, D, Crozet, L, Vieillard, V, Validire, P, André, P, Dieu-Nosjean, M, Alifano, M, Régnard, J, Fridman, W, Sautès-Fridman, C Cremer, I (2011) Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res* 71:5412-5422.

Politi K, Zakowski MF, Fan PD, Schonfeld EA, Pao W, Varmus HE. (2006). Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors. *Genes Dev.* 1;20(11):1496-510.

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

Popat S, Hubner R, Houlston RS. (2005). Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol.* 20;23(3):609-18.

Prior, I.A., Lewis, P.D Mattos, C (2012) A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res* 72:2457-2467.

Ragusa, M., Vannucci, J, Ludovini, V, Bianconi, F, Treggiari, S, Tofanetti, F.R, Flacco, A, Colella, R, Sidoni, A, Crinò, L Puma, F (2013) Impact of Epidermal Growth Factor Receptor and KRAS Mutations on Clinical Outcome in Resected Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Am J Clin Oncol* .

Rami-Porta, R. Tsuboi, M (2009) Sublobar resection for lung cancer. *Eur Respir J* 33:426-435.

Rekhtman, N., Ang, D.C, Riely, G.J, Ladanyi, M Moreira, A.L (2013) KRAS mutations are associated with solid growth pattern and tumor-infiltrating leukocytes in lung adenocarcinoma. *Mod Pathol* 26:1307-1319.

Rekhtman, N., Ang, D.C, Sima, C.S, Travis, W.D Moreira, A.L (2011) Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Mod Pathol* 24:1348-1359.

Remark, R., Alifano, M, Cremer, I, Lupo, A, Dieu-Nosjean, M, Riquet, M, Crozet, L, Ouakrim, H, Goc, J, Cazes, A, Fléjou, J, Gibault, L, Verkarre, V, Régnard, J, Pagès, O, Oudard, S, Mlecnik, B, Sautès-Fridman, C, Fridman, W Damotte, D (2013) Characteristics and Clinical Impacts of the Immune Environments in Colorectal and Renal Cell Carcinoma Lung Metastases: Influence of Tumor Origin. *Clin Cancer Res* 19:4079-4091.

Rho, J.K., Choi, Y.J, Lee, J.K, Ryoo, B, Na, I.I, Yang, S.H, Kim, C.H Lee, J.C (2009) Epithelial to mesenchymal transition derived from repeated exposure to gefitinib determines the sensitivity to EGFR inhibitors in A549, a non-small cell lung cancer cell line. *Lung Cancer* 63:219-226.

Riely, G.J., Johnson, M.L, Medina, C, Rizvi, N.A, Miller, V.A, Kris, M.G, Pietanza, M.C, Azzoli, C.G, Krug, L.M, Pao, W Ginsberg, M.S (2011) A phase II trial of Salirasib in patients with lung adenocarcinomas with KRAS mutations. *J Thorac Oncol* 6:1435-1437.

Riely, G.J., Kris, M.G, Rosenbaum, D, Marks, J, Li, A, Chitale, D.A, Nafa, K, Riedel, E.R, Hsu, M, Pao, W, Miller, V.A Ladanyi, M (2008) Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 14:5731-5734.

Riely, G.J., Kris, M.G, Zhao, B, Akhurst, T, Milton, D.T, Moore, E, Tyson, L, Pao, W, Rizvi, N.A, Schwartz, L.H Miller, V.A (2007) Prospective assessment of discontinuation and reinitiation of erlotinib or gefitinib in patients with acquired resistance to erlotinib or gefitinib followed by the addition of everolimus. *Clin Cancer Res* 13:5150-5155.

Riely, G.J., Politi, K.A, Miller, V.A Pao, W (2006) Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 12:7232-7241.

Rivera, A., Chen, C.C, Ron, N, Dougherty, J.P Ron, Y (2001) Role of B cells as antigen-presenting cells in vivo revisited: antigen-specific B cells are essential for T cell expansion in lymph nodes and for systemic T cell responses to low antigen concentrations. *Int Immunol* 13:1583-1593.

Roberts, P.J. Der, C.J (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26:3291-3310.

Rodig, S.J., Mino-Kenudson, M, Dacic, S, Yeap, B.Y, Shaw, A, Barletta, J.A, Stubbs, H, Law, K, Lindeman, N, Mark, E, Janne, P.A, Lynch, T, Johnson, B.E, Iafrate, A.J Chirieac, L.R (2009) Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. *Clin Cancer Res* 15:5216-5223.

Roskoski R Jr. (2014). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res.* 2014 Jan;79:34-74.

Rosell, R., Carcereny, E, Gervais, R, Vergnenegre, A, Massuti, B, Felip, E, Palmero, R, Garcia-Gomez, R, Pallares, C, Sanchez, J.M, Porta, R, Cobo, M, Garrido, P, Longo, F, Moran, T, Insa, A, De Marinis, F, Corre, R, Bover, I, Illiano, A, Dansin, E, de Castro, J, Milella, M, Reguart, N, Altavilla, G, Jimenez, U, Provencio, M, Moreno, M.A, Terrasa, J, Muñoz-Langa, J, Valdivia, J, Isla, D, Domine, M, Molinier, O, Mazieres, J, Baize, N, Garcia-Campelo, R, Robinet, G, Rodriguez-Abreu, D, Lopez-Vivanco, G, Gebbia, V, Ferrera-Delgado, L, Bombaron, P, Bernabe, R, Bearz, A, Artal, A, Cortesi, E, Rolfo, C, Sanchez-Ronco, M, Drozdowskyj, A, Queralt, C, de Aguirre, I, Ramirez, J.L, Sanchez, J.J, Molina, M.A, Taron, M, Paz-Ares, L (2012) Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13:239-246.

Rosell, R., Moran, T, Queralt, C, Porta, R, Cardenal, F, Camps, C, Majem, M, Lopez-Vivanco, G, Isla, D, Provencio, M, Insa, A, Massuti, B, Gonzalez-Larriba, J.L, Paz-Ares, L,

Bover, I, Garcia-Campelo, R, Moreno, M.A, Catot, S, Rolfo, C, Reguart, N, Palmero, R, Sánchez, J.M, Bastus, R, Mayo, C, Bertran-Alamillo, J, Molina, M.A, Sanchez, J.J, Taron, M (2009) Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 361:958-967.

Rosell, R., Molina, M.A, Costa, C, Simonetti, S, Gimenez-Capitan, A, Bertran-Alamillo, J, Mayo, C, Moran, T, Mendez, P, Cardenal, F, Isla, D, Provencio, M, Cobo, M, Insa, A, Garcia-Campelo, R, Reguart, N, Majem, M, Viteri, S, Carcereny, E, Porta, R, Massuti, B, Queralt, C, de Aguirre, I, Sanchez, J.M, Sanchez-Ronco, M, Mate, J.L, Ariza, A, Benlloch, S, Sanchez, J.J, Bivona, T.G, Sawyers, C.L Taron, M (2011) Pretreatment EGFR T790M mutation and BRCA1 mRNA expression in erlotinib-treated advanced non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations. *Clin Cancer Res* 17:1160-1168.

Rosty C, Young JP, Walsh MD, Clendenning M, Walters RJ, Pearson S, Pavluk E, Nagler B, Pakenas D, Jass JR, Jenkins MA, Win AK, Southey MC, Parry S, Hopper JL, Giles GG, Williamson E, English DR, Buchanan DD. (2013). Colorectal carcinomas with KRAS mutation are associated with distinctive morphological and molecular features. *Mod Pathol*. 2013 Jun;26(6):825-34.

Ruffell, B., Au, A, Rugo, H.S, Esserman, L.J, Hwang, E.S Coussens, L.M (2012) Leukocyte composition of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:2796-2801.

Ruffini, E., Asioli, S, Filosso, P.L, Lyberis, P, Bruna, M.C, Macri, L, Daniele, L Oliaro, A (2009) Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in lung neoplasms. *Ann Thorac Surg* 87:365-71; discussion 371-2.

Rusch, V.W., Crowley, J, Giroux, D.J, Goldstraw, P, Im, J, Tsuboi, M, Tsuchiya, R, Vansteenkiste, J, (2007) The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the N descriptors in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 2:603-612.

Rusch, V.W., Asamura, H, Watanabe, H, Giroux, D.J, Rami-Porta, R, Goldstraw, P (2009) The IASLC lung cancer staging project: a proposal for a new international lymph node map in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 4:568-577.

Russell, P.A., Barnett, S.A, Walkiewicz, M, Wainer, Z, Conron, M, Wright, G.M, Gooi, J, Knight, S, Wynne, R, Liew, D John, T (2013) Correlation of mutation status and survival with predominant histologic subtype according to the new IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification in stage III (N2) patients. *J Thorac Oncol* 8:461-468.

Russell, P.A., Wainer, Z, Wright, G.M, Daniels, M, Conron, M Williams, R.A (2011) Does lung adenocarcinoma subtype predict patient survival?: A clinicopathologic study based on the new International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *J Thorac Oncol* 6:1496-1504.

Saeterdal, I., Bjørheim, J, Lislud, K, Gjertsen, M.K, Bukholm, I.K, Olsen, O.C, Nesland, J.M, Eriksen, J.A, Møller, M, Lindblom, A Gaudernack, G (2001) Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13255-13260.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N, Shimizu, J, Yamazaki, S, Sakihama, T, Itoh, M, Kuniyasu, Y, Nomura, T, Toda, M Takahashi, T (2001) Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 182:18-32.

Sakurada, A., Lara-Guerra, H, Liu, N, Shepherd, F.A Tsao, M (2008) Tissue heterogeneity of EGFR mutation in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 3:527-529.

Salaun, B., de Saint-Vis, B, Pacheco, N, Pacheco, Y, Riesler, A, Isaac, S, Leroux, C, Clair-Moninot, V, Pin, J, Griffith, J, Treilleux, I, Goddard, S, Davoust, J, Kleijmeer, M Lebecque, S (2004) CD208/dendritic cell-lysosomal associated membrane protein is a marker of normal and transformed type II pneumocytes. *Am J Pathol* 164:861-871.

Salmon, H. Donnadieu, E (2012) Within tumors, interactions between T cells and tumor cells are impeded by the extracellular matrix. *Oncoimmunology* 1:992-994.

Salomon, D.S., 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.

Samet, J.M., Avila-Tang, E, Boffetta, P, Hannan, L.M, Olivo-Marston, S, Thun, M.J Rudin, C.M (2009) Lung cancer in never smokers: clinical epidemiology and environmental risk factors. *Clin Cancer Res* 15:5626-5645.

Santarpia, M., De Pas, T.M, Altavilla, G, Spaggiari, L Rosell, R (2013) Moving towards molecular-guided treatments: erlotinib and clinical outcomes in non-small-cell lung cancer patients. *Future Oncol* 9:327-345.

Sato, E., Olson, S.H, Ahn, J, Bundy, B, Nishikawa, H, Qian, F, Jungbluth, A.A, Frosina, D, Gnjjatic, S, Ambrosone, C, Kepner, J, Odunsi, T, Ritter, G, Lele, S, Chen, Y, Ohtani, H, Old, L.J Odunsi, K (2005) Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18538-18543.

Sautès-Fridman, C., Cherfils-Vicini, J, Damotte, D, Fisson, S, Fridman, W.H, Cremer, I Dieu-Nosjean, M (2011) Tumor microenvironment is multifaceted. *Cancer Metastasis Rev* 30:13-25.

Scagliotti, G.V., Krzakowski, M, Szczesna, A, Strausz, J, Makhson, A, Reck, M, Wierzbicki, R.F, Albert, I, Thomas, M, Miziara, J.E.A, Papai, Z.S, Karaseva, N, Thongprasert, S, Portulas, E.D, von Pawel, J, Zhang, K, Selaru, P, Tye, L, Chao, R.C Govindan, R (2012) Sunitinib plus erlotinib versus placebo plus erlotinib in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial. *J Clin Oncol* 30:2070-2078.

Scagliotti, G., Hanna, N, Fossella, F, Sugarman, K, Blatter, J, Peterson, P, Simms, L, Shepherd, F.A (2009) The differential efficacy of pemetrexed according to NSCLC histology: a review of two Phase III studies. *Oncologist* 14:253-263.

Scagliotti, G.V., Parikh, P, von Pawel, J, Biesma, B, Vansteenkiste, J, Manegold, C, Serwatowski, P, Gatzemeier, U, Digumarti, R, Zukin, M, Lee, J.S, Mellempgaard, A, Park, K, Patil, S, Rolski, J, Goksel, T, de Marinis, F, Simms, L, Sugarman, K.P Gandara, D (2008) Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 26:3543-3551.

Schlessinger, J. (2002) Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 110:669-672.

Schreiber, R.D., Old, L.J Smyth, M.J (2011) Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331:1565-1570.

Schröder, A.E., Greiner, A, Seyfert, C Berek, C (1996) Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:221-225.

Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, Linnebacher M, Kienle P, Knaebel HP, Tariverdian M, Benner A, von Knebel Doeberitz M. (2008). Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology*. 134(4):988-97.

Secretan, B., Straif, K, Baan, R, Grosse, Y, El Ghissassi, F, Bouvard, V, Benbrahim-Tallaa, L, Guha, N, Freeman, C, Galichet, L, Cogliano, V (2009) A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncol* 10:1033-1034.

Seki, Y., Yamamoto, N, Tamura, Y, Goto, Y, Shibata, T, Tanioka, M, Asahina, H, Nokihara, H, Yamada, Y, Shimamoto, T, Noguchi, K Tamura, T (2012) Phase I study for ridaforolimus, an oral mTOR inhibitor, in Japanese patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 69:1099-1105.

Selli, C., Bartolozzi, C, Amorosi, A Carini, M (1988) Incidental finding of renal cell carcinoma with histological regressive aspects in a pregnant woman. *Eur Urol* 15:287-289.

Sequist, L.V., Martins, R.G, Spigel, D, Grunberg, S.M, Spira, A, Jänne, P.A, Joshi, V.A, McCollum, D, Evans, T.L, Muzikansky, A, Kuhlmann, G.L, Han, M, Goldberg, J.S, Settleman, J, Iafrate, A.J, Engelman, J.A, Haber, D.A, Johnson, B.E Lynch, T.J (2008) First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. *J Clin Oncol* 26:2442-2449.

Sequist, L.V., Waltman, B.A, Dias-Santagata, D, Digumarthy, S, Turke, A.B, Fidias, P, Bergethon, K, Shaw, A.T, Gettinger, S, Cospser, A.K, Akhavanfard, S, Heist, R.S, Temel, J, Christensen, J.G, Wain, J.C, Lynch, T.J, Vernovsky, K, Mark, E.J, Lanuti, M, Iafrate, A.J, Mino-Kenudson, M Engelman, J.A (2011) Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med* 3:75ra26.

Shah, S., Divekar, A.A, Hilchey, S.P, Cho, H, Newman, C.L, Shin, S, Nechustan, H, Challita-Eid, P.M, Segal, B.M, Yi, K.H Rosenblatt, J.D (2005) Increased rejection of primary tumors in mice lacking B cells: inhibition of anti-tumor CTL and TH1 cytokine responses by B cells. *Int J Cancer* 117:574-586.

Shapiro-Shelef, M. Calame, K (2005) Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 5:230-242.

Sharma, P., Shen, Y, Wen, S, Yamada, S, Jungbluth, A.A, Gnjjatic, S, Bajorin, D.F, Reuter, V.E, Herr, H, Old, L.J Sato, E (2007) CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3967-3972.

Sharma, S.V., Bell, D.W, Settleman, J Haber, D.A (2007) Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 7:169-181.

Shaw, A.T., Yeap, B.Y, Mino-Kenudson, M, Digumarthy, S.R, Costa, D.B, Heist, R.S, Solomon, B, Stubbs, H, Admane, S, McDermott, U, Settleman, J, Kobayashi, S, Mark, E.J, Rodig, S.J, Chirieac, L.R, Kwak, E.L, Lynch, T.J Iafrate, A.J (2009) Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol* 27:4247-4253.

Shaw, A.T., Yeap, B.Y, Solomon, B.J, Riely, G.J, Gainor, J, Engelman, J.A, Shapiro, G.I, Costa, D.B, Ou, S.I, Butaney, M, Salgia, R, Maki, R.G, Varella-Garcia, M, Doebele, R.C, Bang, Y, Kulig, K, Selaru, P, Tang, Y, Wilner, K.D, Kwak, E.L, Clark, J.W, Iafrate, A.J Camidge, D.R (2011) Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 12:1004-1012.

Sheng, L., Luo, M, Sun, X, Lin, N, Mao, W Su, D (2013) Serum fibrinogen is an independent prognostic factor in operable nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* 133:2720-2725.

Shepherd, F.A., Rodrigues Pereira, J, Ciuleanu, T, Tan, E.H, 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, Santabárbara, P, Seymour, L (2005) Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 353:123-132.

Shigematsu, H., Takahashi, T, Nomura, M, Majmudar, K, Suzuki, M, Lee, H, Wistuba, I.I, Fong, K.M, Toyooka, S, Shimizu, N, Fujisawa, T, Minna, J.D Gazdar, A.F (2005) Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 65:1642-1646.

Shim, H.S., Lee, D.H, Park, E.J Kim, S.H (2011) Histopathologic characteristics of lung adenocarcinomas with epidermal growth factor receptor mutations in the International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society lung adenocarcinoma classification. *Arch Pathol Lab Med* 135:1329-1334.

Shimizu, K., Yukawa, T, Hiram, Y, Okita, R, Saisho, S, Maeda, A, Yasuda, K Nakata, M (2012) Heterogeneity of the EGFR mutation status between the primary tumor and metastatic lymph node and the sensitivity to EGFR tyrosine kinase inhibitor in non-small cell lung cancer. *Target Oncol* 4:237-42.

Shomer, N.H., Fox, J.G, Juedes, A.E Ruddle, N.H (2003) Helicobacter-induced chronic active lymphoid aggregates have characteristics of tertiary lymphoid tissue. *Infect Immun* 71:3572-3577.

Slamon, D.J., Leyland-Jones, B, Shak, S, Fuchs, H, Paton, V, Bajamonde, A, Fleming, T, Eiermann, W, Wolter, J, Pegram, M, Baselga, J Norton, L (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344:783-792.

Slebos, R.J., Kibbelaar, R.E, Dalesio, O, Kooistra, A, Stam, J, Meijer, C.J, Wagenaar, S.S, Vanderschueren, R.G, van Zandwijk, N, Mooi, W.J et al. (1990) K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 323:561-565.

Smyrk, T.C., Watson, P, Kaul, K Lynch, H.T (2001) Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer* 91:2417-2422.

So, T., Takenoyama, M, Mizukami, M, Ichiki, Y, Sugaya, M, Hanagiri, T, Sugio, K Yasumoto, K (2005) Haplotype loss of HLA class I antigen as an escape mechanism from immune attack in lung cancer. *Cancer Res* 65:5945-5952.

Sobin, L.H. Compton, C.C (2010) TNM seventh edition: what's new, what's changed: communication from the International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 116:5336-5339.

Socinski, M.A., Goldman, J, El-Hariry, I, Koczywas, M, Vukovic, V, Horn, L, Paschold, E, Salgia, R, West, H, Sequist, L.V, Bonomi, P, Brahmer, J, Chen, L, Sandler, A, Belani, C.P, Webb, T, Harper, H, Huberman, M, Ramalingam, S, Wong, K, Teofilovici, F, Guo, W Shapiro, G.I (2013) A multicenter phase II study of ganetespib monotherapy in patients with genotypically defined advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 19:3068-3077.

Soda, M., Choi, Y.L, Enomoto, M, Takada, S, Yamashita, Y, Ishikawa, S, Fujiwara, S, Watanabe, H, Kurashina, K, Hatanaka, H, Bando, M, Ohno, S, Ishikawa, Y, Aburatani, H, Niki, T, Sohara, Y, Sugiyama, Y Mano, H (2007) Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448:561-566.

Soh, J., Toyooka, S, Ichihara, S, Asano, H, Kobayashi, N, Suehisa, H, Otani, H, Yamamoto, H, Ichimura, K, Kiura, K, Gazdar, A.F Date, H (2008) Sequential molecular changes during multistage pathogenesis of small peripheral adenocarcinomas of the lung. *J Thorac Oncol* 3:340-347.

Song, Z., Zhu, H, Guo, Z, Wu, W, Sun, W Zhang, Y (2013) Correlation of EGFR mutation and predominant histologic subtype according to the new lung adenocarcinoma classification in Chinese patients. *Med Oncol* 30:645.

Song, Z., Zhu, H, Guo, Z, Wu, W, Sun, W Zhang, Y (2013) Prognostic value of the IASLC/ATS/ERS classification in stage I lung adenocarcinoma patients-Based on a hospital study in China. *Eur J Surg Oncol* 39:1262-1268.

Sordella, R., Bell, D.W, Haber, D.A, Settleman, J (2004) Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* 305:1163-1167.

Spigel, D.R., Edelman, M.J, Mok, T, O'Byrne, K, Paz-Ares, L, Yu, W, Rittweger, K, Thurm, H (2012) Treatment Rationale Study Design for the MetLung Trial: A Randomized, Double-Blind Phase III Study of Onartuzumab (MetMab) in Combination With Erlotinib Versus Erlotinib Alone in Patients Who Have Received Standard Chemotherapy for Stage IIIB or IV Met-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer* 13:500-504.

Stämpfli, M.R. Anderson, G.P (2009) How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nat Rev Immunol* 9:377-384.

Stefani, A., Alifano, M, Bobbio, A, Grigoriou, M, Jouni, R, Magdeleinat, P, Regnard, J (2010) Which patients should be operated on after induction chemotherapy for N2 non-small cell lung cancer? Analysis of a 7-year experience in 175 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 140:356-363.

Steinman, L. (2007) A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 13:139-145.

Steinman, R.M. Banchereau, J (2007) Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449:419-426.

Stephens, P., Hunter, C, Bignell, G, Edkins, S, Davies, H, Teague, J, Stevens, C, O'Meara, S, Smith, R, Parker, A, Barthorpe, A, Blow, M, Brackenbury, L, Butler, A, Clarke, O, Cole, J, Dicks, E, Dike, A, Drozd, A, Edwards, K, Forbes, S, Foster, R, Gray, K, Greenman, C, Halliday, K, Hills, K, Kosmidou, V, Lugg, R, Menzies, A, Perry, J, Petty, R, Raine, K, Ratford, L, Shepherd, R, Small, A, Stephens, Y, Tofts, C, Varian, J, West, S, Widaa, S, Yates, A, Basseur, F, Cooper, C.S, Flanagan, A.M, Knowles, M, Leung, S.Y, Louis, D.N, Looijenga, L.H.J, Malkowicz, B, Pierotti, M.A, Teh, B, Chenevix-Trench, G, Weber, B.L, Yuen, S.T, Harris, G, Goldstraw, P, Nicholson, A.G, Futreal, P.A, Wooster, R Stratton, M.R (2004) Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature* 431:525-526.

Strano, S., Lupo, A, Lococo, F, Schussler, O, Loi, M, Younes, M, Bobbio, A, Damotte, D, Regnard, J Alifano, M (2013) Prognostic significance of vascular and lymphatic emboli in resected pulmonary adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg* 95:1204-1210.

Subramanian, J. Govindan, R (2007) Lung cancer in never smokers: a review. *J Clin Oncol* 25:561-570.

Suda, K., Murakami, I, Katayama, T, Tomizawa, K, Osada, H, Sekido, Y, Maehara, Y, Yatabe, Y Mitsudomi, T (2010) Reciprocal and complementary role of MET amplification and EGFR T790M mutation in acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancer. *Clin Cancer Res* 16:5489-5498.

Sun, P., Seol, H, Lee, H.J, Yoo, S.B, Kim, H, Xu, X, Jheon, S, Lee, C, Lee, J Chung, J (2012) High incidence of EGFR mutations in Korean men smokers with no intratumoral heterogeneity of lung adenocarcinomas: correlation with histologic subtypes, EGFR/TTF-1 expressions, and clinical features. *J Thorac Oncol* 7:323-330.

Sun, L., Zhang, Q, Luan, H, Zhan, Z, Wang, C Sun, B (2011) Comparison of KRAS and EGFR gene status between primary non-small cell lung cancer and local lymph node metastases: implications for clinical practice. *J Exp Clin Cancer Res* 30:30.

Suzuki, K., Kachala, S.S, Kadota, K, Shen, R, Mo, Q, Beer, D.G, Rusch, V.W, Travis, W.D Adusumilli, P.S (2011) Prognostic immune markers in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 17:5247-5256.

Suzuki, K., Kadota, K, Sima, C.S, Nitadori, J, Rusch, V.W, Travis, W.D, Sadelain, M Adusumilli, P.S (2013) Clinical impact of immune microenvironment in stage I lung adenocarcinoma: tumor interleukin-12 receptor β 2 (IL-12R β 2), IL-7R, and stromal FoxP3/CD3 ratio are independent predictors of recurrence. *J Clin Oncol* 31:490-498.

Takahashi, T., Sonobe, M, Kobayashi, M, Yoshizawa, A, Menju, T, Nakayama, E, Mino, N, Iwakiri, S, Sato, K, Miyahara, R, Okubo, K, Manabe, T Date, H (2010) Clinicopathologic features of non-small-cell lung cancer with EML4-ALK fusion gene. *Ann Surg Oncol* 17:889-897.

Takamori, S., Noguchi, M, Morinaga, S, Goya, T, Tsugane, S, Kakegawa, T Shimosato, Y (1991) Clinicopathologic characteristics of adenosquamous carcinoma of the lung. *Cancer* 67:649-654.

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.

Takeuchi, K., Choi, Y.L, Soda, M, Inamura, K, Togashi, Y, Hatano, S, Enomoto, M, Takada, S, Yamashita, Y, Satoh, Y, Okumura, S, Nakagawa, K, Ishikawa, Y Mano, H (2008) Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res* 14:6618-6624.

Takeuchi, K., Choi, Y.L, Togashi, Y, Soda, M, Hatano, S, Inamura, K, Takada, S, Ueno, T, Yamashita, Y, Satoh, Y, Okumura, S, Nakagawa, K, Ishikawa, Y Mano, H (2009) KIF5B-ALK, a novel fusion oncokine identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 15:3143-3149.

Takise, A., Kodama, T, Shimosato, Y, Watanabe, S Suemasu, K (1988) Histopathologic prognostic factors in adenocarcinomas of the peripheral lung less than 2 cm in diameter. *Cancer* 61:2083-2088.

Taniguchi, K., Okami, J, Kodama, K, Higashiyama, M Kato, K (2008) Intratumor heterogeneity of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer and its correlation to the response to gefitinib. *Cancer Sci* 99:929-935.

Thaunat, O., Field, A, Dai, J, Louedec, L, Patey, N, Bloch, M, Mandet, C, Belair, M, Bruneval, P, Meilhac, O, Bellon, B, Joly, E, Michel, J Nicoletti, A (2005) Lymphoid

neogenesis in chronic rejection: evidence for a local humoral alloimmune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14723-14728.

Therasse, P., Arbuck, S.G, Eisenhauer, E.A, Wanders, J, Kaplan, R.S, Rubinstein, L, Verweij, J, Van Glabbeke, M, van Oosterom, A.T, Christian, M.C Gwyther, S.G (2000) New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 92:205-216.

Thunnissen, E., Bubendorf, L, Dietel, M, Elmberger, G, Kerr, K, Lopez-Rios, F, Moch, H, Olszewski, W, Pauwels, P, Penault-Llorca, F Rossi, G (2012) EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations. *Virchows Arch* 461:245-257.

Tiacci, E., Trifonov, V, Schiavoni, G, Holmes, A, Kern, W, Martelli, M.P, Pucciarini, A, Bigerna, B, Pacini, R, Wells, V.A, Sportoletti, P, Pettirossi, V, Mannucci, R, Elliott, O, Liso, A, Ambrosetti, A, Pulsoni, A, Forconi, F, Trentin, L, Semenzato, G, Inghirami, G, Capponi, M, Di Raimondo, F, Patti, C, Arcaini, L, Musto, P, Pileri, S, Haferlach, C, Schnittger, S, Pizzolo, G, Foà, R, Farinelli, L, Haferlach, T, Pasqualucci, L, Rabadan, R Falini, B (2011) BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 364:2305-2315.

Tochigi, N., Dacic, S, Nikiforova, M, Cieply, K.M Yousem, S.A (2011) Adenosquamous carcinoma of the lung: a microdissection study of KRAS and EGFR mutational and amplification status in a western patient population. *Am J Clin Pathol* 135:783-789.

Togashi, Y., Soda, M, Sakata, S, Sugawara, E, Hatano, S, Asaka, R, Nakajima, T, Mano, H Takeuchi, K (2012) KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only. *PLoS One* 7:e31323.

Tomizawa, K., Suda, K, Onozato, R, Kosaka, T, Endoh, H, Sekido, Y, Shigematsu, H, Kuwano, H, Yatabe, Y Mitsudomi, T (2011) Prognostic and predictive implications of HER2/ERBB2/neu gene mutations in lung cancers. *Lung Cancer* 74:139-144.

Topalian, S.L., Hodi, F.S, Brahmer, J.R, Gettinger, S.N, Smith, D.C, McDermott, D.F, Powderly, J.D, Carvajal, R.D, Sosman, J.A, Atkins, M.B, Leming, P.D, Spigel, D.R, Antonia, S.J, Horn, L, Drake, C.G, Pardoll, D.M, Chen, L, Sharfman, W.H, Anders, R.A, Taube, J.M, McMiller, T.L, Xu, H, Korman, A.J, Jure-Kunkel, M, Agrawal, S, McDonald, D, Kollia, G.D, Gupta, A, Wigginton, J.M Sznol, M (2012) Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366:2443-2454.

Tougeron, D., Maby, P, Elie, N, Fauquembergue, E, Le Pessot, F, Cornic, M, Sabourin, J, Michel, P, Frébourg, T Latouche, J (2013) Regulatory T lymphocytes are associated with less aggressive histologic features in microsatellite-unstable colorectal cancers. *PLoS One* 8:e61001.

Travis, W.D., Brambilla, E, Noguchi, M, Nicholson, A.G, Geisinger, K, Yatabe, Y, Ishikawa, Y, Wistuba, I, Flieder, D.B, Franklin, W, Gazdar, A, Hasleton, P.S, Henderson, D.W, Kerr, K.M, Petersen, I, Roggli, V, Thunnissen, E Tsao, M (2013) Diagnosis of lung cancer in small

biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med* 137:668-684.

Travis, W.D., Brambilla, E, Noguchi, M, Nicholson, A.G, Geisinger, K.R, Yatabe, Y, Beer, D.G, Powell, C.A, Riely, G.J, Van Schil, P.E, Garg, K, Austin, J.H.M, Asamura, H, Rusch, V.W, Hirsch, F.R, Scagliotti, G, Mitsudomi, T, Huber, R.M, Ishikawa, Y, Jett, J, Sanchez-Cespedes, M, Sculier, J, Takahashi, T, Tsuboi, M, Vansteenkiste, J, Wistuba, I, Yang, P, Aberle, D, Brambilla, C, Flieder, D, Franklin, W, Gazdar, A, Gould, M, Hasleton, P, Henderson, D, Johnson, B, Johnson, D, Kerr, K, Kuriyama, K, Lee, J.S, Miller, V.A, Petersen, I, Roggli, V, Rosell, R, Saijo, N, Thunnissen, E, Tsao, M Yankelewitz, D (2011) International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 6:244-285.

Travis, W.D. (2009) Reporting lung cancer pathology specimens. Impact of the anticipated 7th Edition TNM classification based on recommendations of the IASLC Staging Committee. *Histopathology* 54:3-11.

Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, *et al.* Pathology and Genetics. Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon, France: IARC Press, 2004. World Health Organization Classification of Tumours.

Travis, W.D., Rush, W, Flieder, D.B, Falk, R, Fleming, M.V, Gal, A.A Koss, M.N (1998) Survival analysis of 200 pulmonary neuroendocrine tumors with clarification of criteria for atypical carcinoid and its separation from typical carcinoid. *Am J Surg Pathol* 22:934-944.

Trédaniel, J., Aarab-Terrisse, S, Teixeira, L, Savinelli, F, Fraboulet, S, Gossot, D Hennequin, C (2009) [Atmospheric air pollution and lung cancer: epidemiologic data]. *Rev Mal Respir* 26:437-45; quiz 481, 484.

Tsao, M., Sakurada, A, Cutz, J, Zhu, C, Kamel-Reid, S, Squire, J, Lorimer, I, Zhang, T, Liu, N, Daneshmand, M, Marrano, P, da Cunha Santos, G, Lagarde, A, Richardson, F, Seymour, L, Whitehead, M, Ding, K, Pater, J Shepherd, F.A (2005) Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 353:133-144.

Tsuchikawa, T., Md, M.M, Yamamura, Y, Shichinohe, T, Hirano, S Kondo, S (2012) The immunological impact of neoadjuvant chemotherapy on the tumor microenvironment of esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 19:1713-1719.

Tsuda, N., Chang, D.Z, Mine, T, Efferson, C, García-Sastre, A, Wang, X, Ferrone, S Ioannides, C.G (2007) Taxol increases the amount and T cell activating ability of self-immune stimulatory multimolecular complexes found in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 67:8378-8387.

Tsuta, K., Kawago, M, Inoue, E, Yoshida, A, Takahashi, F, Sakurai, H, Watanabe, S, Takeuchi, M, Furuta, K, Asamura, H Tsuda, H (2013) The utility of the proposed

IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma subtypes for disease prognosis and correlation of driver gene alterations. *Lung Cancer* 81:371-376.

Tanvetyanon T, Eikman EA, Sommers E, et al. Computed tomography response, but not positron emission tomography scan response, predicts survival after neoadjuvant chemotherapy for resectable non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2008; 26:4610–4616.

Tsutani, Y., Miyata, Y, Nakayama, H, Okumura, S, Adachi, S, Yoshimura, M Okada, M (2014) Appropriate sublobar resection choice for ground glass opacity-dominant clinical stage IA lung adenocarcinoma: wedge resection or segmentectomy. *Chest* 145:66-71.

Turke, A.B., Zejnullahu, K, Wu, Y, Song, Y, Dias-Santagata, D, Lifshits, E, Toschi, L, Rogers, A, Mok, T, Sequist, L, Lindeman, N.I, Murphy, C, Akhavanfard, S, Yeap, B.Y, Xiao, Y, Capelletti, M, Iafrate, A.J, Lee, C, Christensen, J.G, Engelman, J.A Jänne, P.A (2010) Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer Cell* 17:77-88.

Turtle, C.J., Swanson, H.M, Fujii, N, Estey, E.H Riddell, S.R (2009) A distinct subset of self-renewing human memory CD8+ T cells survives cytotoxic chemotherapy. *Immunity* 31:834-844.

Unsal, E., Atalay, F, Atikcan, S Yilmaz, A (2004) Prognostic significance of hemostatic parameters in patients with lung cancer. *Respir Med* 98:93-98.

Van Baren N, Baurain JF, Coulie PG. (2011). Lymphoid neogenesis in melanoma: What does it tell us? *Oncoimmunology*. 2013 Jan 1;2(1):e22505.

Veronesi, G., Maisonneuve, P, Pelosi, G, Casiraghi, M, Agolia, B.G, Borri, A, Travaini, L.L, Bellomi, M, Rampinelli, C, Brambilla, D, Bertolotti, R Spaggiari, L (2011) Screening-detected lung cancers: is systematic nodal dissection always essential?. *J Thorac Oncol* 6:525-530.

Vesalainen, S., Lipponen, P, Talja, M Syrjänen, K (1994) Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 30A:1797-1803.

Vivier, E., Tomasello, E, Baratin, M, Walzer, T Ugolini, S (2008) Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9:503-510.

Vivier, E., Ugolini, S, Blaise, D, Chabannon, C Brossay, L (2012) Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol* 12:239-252.

Voldborg, B.R., Damstrup, L, Spang-Thomsen, M Poulsen, H.S (1997) Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* 8:1197-1206.

Wang, W., Gu, L, Liu, W, Li, G, Liu, H Ma, Z (2011) ALK-positive extramedullary plasmacytoma with expression of the CLTC-ALK fusion transcript. *Pathol Res Pract* 207:587-591.

Warth, A., Muley, T, Meister, M, Stenzinger, A, Thomas, M, Schirmacher, P, Schnabel, P.A, Budczies, J, Hoffmann, H Weichert, W (2012) The novel histologic International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival. *J Clin Oncol* 30:1438-1446.

Warth, A., Penzel, R, Lindenmaier, H, Brandt, R, Stenzinger, A, Herpel, E, Goepfert, B, Thomas, M, Herth, F.J.F, Dienemann, H, Schnabel, P.A, Schirmacher, P, Hoffmann, H, Muley, T Weichert, W (2013) EGFR, KRAS, BRAF and ALK Gene alterations in lung adenocarcinomas: patient outcome, interplay with morphology and immunophenotype. *Eur Respir J* .:

Watanabe, S., Tanaka, J, Ota, T, Kondo, R, Tanaka, H, Kagamu, H, Ichikawa, K, Koshio, J, Baba, J, Miyabayashi, T, Narita, I Yoshizawa, H (2011) Clinical responses to EGFR-tyrosine kinase inhibitor retreatment in non-small cell lung cancer patients who benefited from prior effective gefitinib therapy: a retrospective analysis. *BMC Cancer* 11:1.

Watanabe, S. Asamura, H (2009) Lymph node dissection for lung cancer: significance, strategy, and technique. *J Thorac Oncol* 4:652-657.

Weiss, A. Littman, D.R (1994) Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76:263-274.

White, C.M., Martin, B.K, Lee, L.F, Haskill, J.S Ting, J.P (1998) Effects of paclitaxel on cytokine synthesis by unprimed human monocytes, T lymphocytes, and breast cancer cells. *Cancer Immunol Immunother* 46:104-112.

Whiteside, T.L. (2008) The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 27:5904-5912.

Wick, M.R., Ritter, J.H Humphrey, P.A (1997) Sarcomatoid carcinomas of the lung: a clinicopathologic review. *Am J Clin Pathol* 108:40-53.

William, W.N.J., Pataer, A, Kalhor, N, Correa, A.M, Rice, D.C, Wistuba, I.I, Heymach, J, Lee, J.J, Kim, E.S, Munden, R, Gold, K.A, Papadimitrakopoulou, V, Swisher, S.G, Erasmus, J.J (2013) Computed tomography RECIST assessment of histopathologic response and prediction of survival in patients with resectable non-small-cell lung cancer after neoadjuvant chemotherapy. *J Thorac Oncol* 8:222-228.

Wirth, N., Bohadana, A, Spinosa, A Martinet, Y (2009) [Respiratory diseases related to passive smoking]. *Rev Mal Respir* 26:667-678.

Woo, T., Okudela, K, Mitsui, H, Tajiri, M, Yamamoto, T, Rino, Y, Ohashi, K Masuda, M (2012) Prognostic value of the IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma in stage I disease of Japanese cases. *Pathol Int* 62:785-791.

Wright, G., Manser, R.L, Byrnes, G, Hart, D Campbell, D.A (2006) Surgery for non-small cell lung cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Thorax* 61:597-603.

- Wu, J., Yu, C, Chang, Y, Yang, C, Shih, J Yang, P (2011) Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on "uncommon" epidermal growth factor receptor mutations of unknown clinical significance in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 17:3812-3821.
- Xu, L., Tavora, F Burke, A (2013) Histologic features associated with metastatic potential in invasive adenocarcinomas of the lung. *Am J Surg Pathol* 37:1100-1108.
- Yamane, Y., Ishii, G, Goto, K, Kojima, M, Nakao, M, Shimada, Y, Nishiwaki, Y, Nagai, K, Kohroggi, H Ochiai, A (2010) A novel histopathological evaluation method predicting the outcome of non-small cell lung cancer treated by neoadjuvant therapy: the prognostic importance of the area of residual tumor. *J Thorac Oncol* 5:49-55.
- Yatabe, Y., Matsuo, K Mitsudomi, T (2011) Heterogeneous distribution of EGFR mutations is extremely rare in lung adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 29:2972-2977.
- Yoshizawa, A., Motoi, N, Riely, G.J, Sima, C.S, Gerald, W.L, Kris, M.G, Park, B.J, Rusch, V.W Travis, W.D (2011) Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod Pathol* 24:653-664.
- Yoshizawa, A., Sumiyoshi, S, Sonobe, M, Kobayashi, M, Fujimoto, M, Kawakami, F, Tsuruyama, T, Travis, W.D, Date, H Haga, H (2013) Validation of the IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification for prognosis and association with EGFR and KRAS gene mutations: analysis of 440 Japanese patients. *J Thorac Oncol* 8:52-61.
- Zhang, H., Berezov, A, Wang, Q, Zhang, G, Drebin, J, Murali, R Greene, M.I (2007) ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest* 117:2051-2058.
- Zhang, J., Wu, J, Tan, Q, Zhu, L Gao, W (2013) Why do pathological stage IA lung adenocarcinomas vary from prognosis?: a clinicopathologic study of 176 patients with pathological stage IA lung adenocarcinoma based on the IASLC/ATS/ERS classification. *J Thorac Oncol* 8:1196-1202.
- Zhang, L., Conejo-Garcia, J.R, Katsaros, D, Gimotty, P.A, Massobrio, M, Regnani, G, Makrigiannakis, A, Gray, H, Schlienger, K, Liebman, M.N, Rubin, S.C Coukos, G (2003) Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348:203-213.
- Zhang, X., Shin, J, Kim, J, Oh, J, Yoon, S, Jung, C Kang, J (2012) Synergistic antitumor efficacy of sequentially combined paclitaxel with sorafenib in vitro and in vivo NSCLC models harboring KRAS or BRAF mutations. *Cancer Lett* 322:213-222.
- Zhang Y, Huang S, Gong D, Qin Y, Shen Q. (2010). Programmed death-1 upregulation is correlated with dysfunction of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human non-small cell lung cancer. *Cell Mol Immunol.*;7(5):389-95.
- Zitvogel, L., Apetoh, L, Ghiringhelli, F Kroemer, G (2008) Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 8:59-73.

Zitvogel, L., Apetoh, L, Ghiringhelli, F, André, F, Tesniere, A Kroemer, G (2008) The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success?. J Clin Invest 118:1991-2001.