

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Médecine

ANNÉE (2013)

THÈSE N°

ETUDE DE L'EXPRESSION DE L'EGFR ET DES MUTATIONS DE *KRAS* ET *BRAF* DANS LES ADENOCARCINOMES NASO-SINUSIENS DE TYPE INTESTINAL

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement

le 4 octobre 2013

par

Fabrice PROJETTI

né le 28 février 1984, à Toulouse

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M le Professeur François LABROUSSEPrésident
Mme le Professeur Marie-Odile JAUBERTEAU-MARCHAN..... Juge
M le Professeur Jean-Pierre BESSEDE Juge
M le Professeur Jean-Jacques MOREAU..... Juge
Mme le Professeur Emmanuelle URO-COSTE Membre invité
Mme le Docteur Karine DURAND..... Membre invité
M le Docteur Béma COULIBALY Membre invité

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Médecine

ANNÉE (2013)

THÈSE N°

ETUDE DE L'EXPRESSION DE L'EGFR ET DES MUTATIONS DE *KRAS* ET *BRAF* DANS LES ADENOCARCINOMES NASO-SINUSIENS DE TYPE INTESTINAL

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement

le 4 octobre 2013

par

Fabrice PROJETTI

né le 28 février 1984, à Toulouse

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M le Professeur François LABROUSSEPrésident
Mme le Professeur Marie-Odile JAUBERTEAU-MARCHAN..... Juge
M le Professeur Jean-Pierre BESSEDE Juge
M le Professeur Jean-Jacques MOREAU Juge
Mme le Professeur Emmanuelle URO-COSTE Membre invité
Mme le Docteur Karine DURAND..... Membre invité
M le Docteur Béma COULIBALY Membre invité

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Médecine

DOYEN DE LA FACULTE

M le Professeur VALLEIX Denis

ASSESEURS

M le Professeur LASKAR Marc

M le Professeur MOREAU Jean-Jacques

M le Professeur PREUX Pierre-Marie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

*C.S = Chef de Service

ABOYANS Victor	CARDIOLOGIE
ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ADENIS Jean-Paul	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE, VIROLOGIE
ALDIGIER Jean-Claude	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD Françoise (C.S)	MEDECINE INTERNE
ARNAUD Jean-Paul	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
AUBARD Yves (C.S)	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
AUBRY Karine	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BEDANE Christophe (C.S)	DERMATOLOGIE-VENERELOGIE
BERTIN Philippe (C.S)	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre (C.S)	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BONNAUD François	PNEUMOLOGIE
BORDESSOULE Dominique (C.S)	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE Pierre (C.S)	RADIOTHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre (C.S)	PSYCHIATRIE ADULTES
COGNE Michel (C.S)	IMMUNOLOGIE
COLOMBEAU Pierre	UROLOGIE
CORNU Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO- VASCULAIRE
COURATIER Philippe (C.S)	NEUROLOGIE
DANTOINE Thierry	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT
DARDE Marie-Laure (C.S)	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
DESCAZEAUD Aurélien	UROLOGIE
DESSPORT Jean-Claude	NUTRITION
DRUET-CABANAC Michel (C.S)	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL
DUMAS Jean-Philippe (C.S)	UROLOGIE
ESSIG Marie (C.S)	NEPHROLOGIE
FAUCHAIS Anne-Laure (C.S)	MEDECINE INTERNE

FEISS Pierre	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION
FEUILLARD Jean (C.S)	CHIRURGICALE
FOURCADE Laurent (C.S)	HEMATOLOGIE
FUNALOT Benoît	CHIRURGIE INFANTILE
GAINANT Alain	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
GUIGONIS Vincent	CHIRURGIE DIGESTIVE
JACCARD Arnaud	PEDIATRIE
JAUBERTEAU-MARCHAN Marie-Odile	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION
LABROUSSE François (C.S)	IMMUNOLOGIE
LACROIX Philippe	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
LASKAR Marc (C.S)	MEDECINE VASCULAIRE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne (C.S)	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO- VASCULAIRE
LOUSTAUD-RATTI Véronique	PEDIATRIE
MABIT Christian (C.S)	HEPATOLOGIE
MAGY Laurent	ANATOMIE
MARQUET Pierre (C.S)	NEUROLOGIE
MATHONNET Muriel	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
MELLONI Boris (C.S)	CHIRURGIE DIGESTIVE
MERLE Louis	PNEUMOLOGIE
MONTEIL Jacques (C.S)	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
MOREAU Jean-Jacques (C.S)	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
MOULIES Dominique	NEUROCHIRURGIE
MOUNAYER Charbel	CHIRURGIE INFANTILE
NATHAN-DENIZOT Nathalie (C.S)	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
PARAF François (C.S)	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
PLOY Marie-Cécile (C.S)	MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE
PREUX Pierre-Marie (C.S)	BACTERIOLOGIE, VIROLOGIE
ROBERT Pierre-Yves (C.S)	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
SALLE Jean-Yves (C.S)	OPHTALMOLOGIE
SAUTEREAU Denis (C.S)	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
STURTZ Franck (C.S)	GASTRO-ENTEROLOGIE, HEPATOLOGIE
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
TREVES Richard	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES
TUBIANA-MATHIEU Nicole (C.S)	RHUMATOLOGIE
VALLAT Jean-Michel	CANCEROLOGIE
VALLEIX Denis (C.S)	NEUROLOGIE
VERGNENEGRE Alain	ANATOMIE - CHIRURGIE GENERALE
VERGNE-SALLE Pascale	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
VIDAL Elisabeth	THERAPEUTIQUE
VIGNON Philippe (C.S)	MEDECINE INTERNE
VINCENT François	REANIMATION MEDICALE
VIROT Patrice (C.S)	PHYSIOLOGIE
	CARDIOLOGIE

WEINBRECK Pierre (C.S)
YARDIN Catherine (C.S)

MALADIES INFECTIEUSES
CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE

PROFESSEUR DES UNIVERSITES

BUCHON Daniel

MEDECINE GENERALE

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

BUISSON Jean-Gabriel
DUMOITIER Nathalie
PREVOST Martine

MEDECINE GENERALE
MEDECINE GENERALE
MEDECINE GENERALE

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AJZENBERG Daniel
ANTONINI Marie-Thérèse (C.S)
BOURTHOUMIEU Sylvie
BOUTEILLE Bernard
CHABLE Hélène
DURAND-FONTANIER Sylvaine
ESCLAIRE Françoise
HANTZ Sébastien
LAROCHE Marie-Laure
LE GUYADER Alexandre

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
PHYSIOLOGIE
CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
ANATOMIE
BIOLOGIE CELLULAIRE
BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PHARMACOLOGIE CLINIQUE
CHIRURGIE THORACIQUE ET
CARDIOVASCULAIRE
EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et
PREVENTION
BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE - HYGIENE
HOSPITALIERE
PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
BIOLOGIE CELLULAIRE

MARIN Benoît

MOUNIER Marcelle

PICARD Nicolas
QUELVEN-BERTIN Isabelle
TERRO Faraj

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

MENARD Dominique

MEDECINE GENERALE

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

CAIRE François

NEUROCHIRURGIE

Remerciements à tous ceux qui ont participé (de près ou de loin) à ce travail

Au membres du Jury

Au Professeur François Labrousse

Merci d'avoir accepté la présidence de cette thèse et merci pour cette aventure Limougeaude au sein de votre service qui m'a permis d'atteindre une certaine maturité autant sur le plan diagnostique que sur celui de la recherche. Merci de m'avoir aiguillé sur ce sujet, permis d'y rester, de m'avoir fait confiance, et pour toutes vos critiques constructives. Veuillez trouver dans ce travail le témoignage de ma gratitude et de mon respect pour ces années amicales d'enseignements et de conseils.

Au Professeur Marie-Odile Jauberteau-Marchan

Merci d'avoir accepté de juger ce travail. Je tenais à vous exprimer ma reconnaissance au travers de cette thèse qui a débutée au sein de votre équipe de recherche lors de mes travaux de Master 2.

Au Professeur Jean-Pierre Bessède

Merci d'avoir accepté de juger ce travail, et bien entendu merci d'avoir donné toute la « matière » à ce sujet. Sans l'aide conjointe de votre service et de celui de Neurochirurgie nous n'aurions pas pu décrire sur le plan pathologique et moléculaire une des plus grande série de ces tumeurs rares.

Au Professeur Jean-Jacques Moreau

Merci d'avoir accepté de juger ce travail, d'avoir permis à cette série d'exister, et de m'avoir fourni votre regard clinique et chirurgical sur ces tumeurs particulières.

Au Professeur Marie-Bernadette Delisle

Même si vos obligations ne vous ont pas permis d'assister à ma thèse, vous avez porté un regard sur ce travail, notamment au travers du semestre que vous m'avez permis de réaliser dans votre service et qui a constitué une expérience très enrichissante, en particulier sur ces tumeurs de « l'interface ». Je tenais à vous exprimer toute ma reconnaissance pour la part que vous avez pris dans ma formation et en perspective de notre future collaboration.

Au Professeur Emmanuelle Uro-Coste

Merci d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous remercie aussi pour cette aventure Toulousaine qui m'a permis à vos côtés, toujours dans un esprit de convivialité, de progresser dans cette spécialité parfois déroutante et de participer à des travaux de recherche sur des pistes originales et attrayantes. J'espère que notre future collaboration en sera tout aussi intéressante.

Au Docteur Karine Durand

Merci d'avoir accepté de juger ce travail et d'y avoir participé. Merci de m'avoir pris en charge dès mes premiers balbutiements « moléculaires ». Ton enseignement, tes conseils, tes critiques (parfois vives ☺), m'ont toujours permis d'avancer et m'ont permis d'acquérir une certaine rigueur et autonomie scientifique que la médecine seule ne peut nous apporter. Merci aussi pour le dynamisme et la bonne humeur que tu insuffles à ton équipe.

Au Docteur Béma Coulibaly

Merci d'avoir accepté de juger ce travail et d'y avoir participé. Merci d'avoir pris part activement à l'enseignement des internes et de nous avoir transmis d'une manière simple et rationnelle une partie de notre futur métier. Merci aussi à tes rires quotidiens et à ta porte toujours ouverte. Ca y est, j'ai enfin coupé le cordon !

Au Laboratoire de Pathologie de Limoges

A mes co-internes

Laura, c'est à moi de te remercier d'avoir partagé ce bureau avec moi. Ces années d'entre-aide, de challenge, de défis, d'aventure (oh Poitiers...), de jovialité (sauf tôt le matin) et d'amitié nous ont été grandement bénéfiques dans notre vie professionnelle et personnelle. Je te souhaite à mon tour, toute la réussite et tout le bonheur que tu mérites bien entendu, and « Have Fun » !

Auréli, merci d'avoir été ma maman de substitution ☺. Ton aide, ta gentillesse et ton aisance en anapath m'ont permis de mieux me concentrer sur ma thèse. J'espère toutefois avoir quand même joué mon rôle d'interne senior...oui oui promis on fera la séance placenta ☺.

Anne, ça y est tu es grande ! Prends bien soin de mon microscope et des petits nouveaux, et amuses-toi bien dans la meilleure des spécialités.

Aux médecins du service

Merci de m'avoir appris mon métier. Manuella, merci pour ton implication dans la pédagogie, en particulier ces séances de lames matinales ! Isabelle, François P. Angélique, merci de m'avoir accueilli sur Limoges, merci pour ton aide diagnostique et en recherche et merci de nous avoir légué l'EGFR. Véronique, Catherine, Yannick, Barbara.

A l'immuno

Brigitte, Cédric, Pascale, Annie, Sandrine, merci d'avoir souffert à mes exigences. Toutes ces photos ce sont vos immunos et ce sont de magnifiques coupes ☺ !

Au reste de la technique

Merci à mes technicien(ne)s préféré(e)s ! Merci pour votre participation active à notre formation et pour ces bons moments passés en macro. Tata et Elodie, merci pour tous ces spots de TMA (non décollés ☺). Chouchou, merci d'avoir veillé sur moi ! Marie, t'as oublié de breveter ta grille sein, je rapporte ça au bercail ☺. Damien, merci pour tes conseils avisés sur cette nouvelle technologie by Xenoblade®, promis je trainerais plus au JPS. Stéphanie...hops. Fanny, maintenant que je pars tu peux me déclarer ta flamme ! Kim, c'est triste on va plus pouvoir se chamailler. Carole, plein de bisous. Estelle, ça restera entre nous. Sylvie, Audrey.

Aux secrétaires

Pascale B, merci pour ton aide à notre « perdu de vue » Limougeaud. Tu vas t'ennuyer sans mes exigences. Jojo, Sandra, Nadine, Christophe. Merci de bien bien relire ce document ☺.

A tous les autres

Nicole, Dany, Katia, merci d'avoir sorti tous ces blocs et lames...cependant maintenant que l'étude est finie ☺. Françoise, pour cet amour commun de l'hémostase ☺.

A la Plateforme d'Oncologie Moléculaire de Limoges

Merci pour votre encadrement, tout aussi rigide que ludique voir dangereux, dans l'apprentissage de ce monde obscur de la biologie moléculaire. Sylvain, bon ok ça sera encore la prochaine fois le Nobel, merci pour ces lectures de séquence et ces dérapages ☺. Emilie, merci pour toutes ces FISH que tu as réalisées. Marion, Denis. Sandrine R, merci de m'avoir initié à cette science du tube, merci pour ta participation, au pied levé, dans ce travail. Alain, merci pour ton aide à notre « perdu de vue » Limougeaud, à l'utilisation du TMA...un homme à tout faire ☺.

Au Laboratoire de Cytogénétique de Limoges

Et plus particulièrement au Pr Cathy Yardin et au Dr Sylvie Bourthoumieu. Merci pour votre accueil, pour ces belles photos de FISH et pour votre cadeau centromérique 12 et 17,

A l'Equipe d'Accueil 3842 « Homéostasie Cellulaire et Pathologies » de Limoges

Merci à toute l'équipe pour votre accueil et vos conseils.

Au Service d'Oncologie Médicale de Limoges

Sophie, merci pour ton aide statistique et d'avoir souffert à toutes mes requêtes toujours rapidement et dans la bonne humeur. Des chocolats ou des cannelés ?!

Au laboratoire Roche

Et notamment à David Bessière. Merci pour leur soutien dans ce type de travail de recherche.

Aux autres Services Limougeaude qui m'ont vu passer

Au Service de Néphrologie, et plus particulièrement au Pr Aldigier, au Pr Marie Essig, à Vincent, Jean-Philippe, Frédérique, Céline..., merci de m'avoir initié à Limoges.

Au Laboratoire d'hématologie, merci pour ce semestre.

Au Service de Neurochirurgie, merci pour toutes ces fiches de consultations.

Au Service de Radiologie, merci pour ces beaux clichés.

Aux autres Limougeaude

Même si vous ne m'avez pas beaucoup vu cette année je vous remercie de m'avoir vu avant. Thomas, combien déjà ? Ah oui 57117 mètres ☺. Tristan, combien déjà ? C'était 118 km/h ? Jon, merci pour ces années Toulousaines et Limougeaude...qu'y a-t-il après ? Elise, Delphine, FX, Tom, pardon pour tes dents. Maxime, le meilleur externe ! Guillaume O, JB, Jerem's...

A Esquirol

Merci de m'avoir logé au calme dans cette ambiance studieuse propice à l'écriture. Ne vous méprenez pas j'étais libre de sortir ☺. Petit clin d'œil à Fax, Nara, Lina, Armen et les autres.

A mes futurs collègues Toulousains

Cathy, Anne, Ghislaine, Isabelle, Nada, Marie-laure, Céline, Flo, Caro, et à l'ensemble du personnel du Laboratoire de Pathologie de Toulouse Rangueil. Ca c'est bien passé six mois, ça devrait bien se passer plus longtemps !

Aux autres Toulousains

Aux carabins et Co

Jojo, je t'aime aussi. Aurélien, une grande amitié brisée juste pour une histoire de cœur ☺...ok c'est bon c'est pardonné enfin uniquement si tu m'envoies tous tes futurs prélèvements ! Scapoul, on se déguise ?! Matou, on se fait une b*fle ☺. Sarah et Nico, love biz kiss. Cerea, quand est ce qu'on vieillit ? Hao et Hernanie, c'est pour quand la crémaillère ? Emilie, on sort les poubelles ? Jaudon, Opium forever. Yo, Opium Nostalgie. JE, t'aurais fait un bon foetopath. Aldjia, Pozzo, Payoute, Laurent B, Sivi, Marie, Guilli, Manu M, Tarik, Marine B, Sibonas, Mymy, Sami, Manu B...

Aux pathologistes et Co

Audrey, bientôt la co-habitation ! Laureline, c'est bien aussi la dermato...surtout en anapath ! Sarah P, bientôt tout plein de missions ! Aichatou, encore imbattue à ce jour avec 500 blocs ☺. Mony, on revient quand tu veux ! Camille, Max, Romain, Claire, Julie, Limoges forever. Emilie et les autres.

A ceux qui sont plus loin

Julien, Cabou et Pich, préparez nos chambres on arrive !

A mes proches et Co

A Manon, merci de m'avoir supporté pendant toutes ces épreuves médicales (soirées ☺, internat, thèse...qu'y a-t-il après ?), d'avoir relu ce charabia dans ce luxueux studio d'Esquirol Paradise. Ca mérite bien de gros bisous...bon ok, peut être un cadeau ! Evidemment à maman, merci de m'avoir fait aussi beau et intelligent ☺, d'avoir relu ce charabia. A mon père, promis j'essaierais d'être moins grognon...mais j'aime râler ! Guillaume, il est où mon bon ☺. Jérôme, Aline, Anthony, Marine, Estelle, Théo, Noah, Louis, Elsa, Annick, Jacques, Eric, Marie-Françoise, Nadine, Damien, Philippe, Moumette, Fany, Rémy, Lénou, arrête de baver ! Cookie, merci pour tous tes poils. Ludo, Vali, Vincent, Arnaud...

A ma thèse

Que sa vie soit longue et pleine d'expérience et qu'elle ait beaucoup d'enfants.

A ceux que j'ai oubliés et qui ne m'en tiendront pas rigueur

Des Bisous à Tous

Et n'oublions pas si Limoges est à 3 h de tout, Toulouse est à 3 h de Limoges (ou parfois moins).

A Moi !

Sommaire

Abréviations	11
1. Introduction	12
2. Généralités	13
2.1. Développement, composition et fonction des cavités naso-sinusiennes	13
2.1.1. Embryogénèse ⁹⁻¹²	13
2.1.2. Anatomie ^{9,13-17}	15
2.1.3. Histologie ^{9,12,16,18,19}	20
2.1.4. Physiologie ^{12,16,18-20}	23
2.2. Description des adénocarcinomes naso-sinusiens de type intestinal	24
2.2.1. Epidémiologie	24
2.2.2. Aspects cliniques	25
2.2.3. Aspects radiologiques	27
2.2.4. Aspects anatomo-pathologiques	29
2.2.5. Stade tumoral	39
2.2.6. Pronostic, traitement, évolution et surveillance	40
2.2.7. Facteurs de risque, physiopathologie et prévention	41
2.3. Mécanismes de l'oncogénèse et perspectives thérapeutiques des ITACs : face-à-face avec les CCRs	45
3. Objectifs et déroulement du travail	51
4. Etude de l'EGFR et des mutations de <i>KRAS</i> et <i>BRAF</i> dans une série de 39 ITACs	52
4.1. Objectif	52
4.2. Matériels et méthodes	52
4.2.1. Patients et prélèvements tissulaires	52
4.2.2. Analyse de l'expression protéique de l'EGFR par IHC	53
4.2.3. Analyse du nombre de copies de l' <i>EGFR</i> par FISH	54
4.2.4. Extraction de l'ADN génomique	55
4.2.5. Analyse des mutations de l' <i>EGFR</i> , de <i>KRAS</i> et <i>BRAF</i>	56
4.2.6. Extraction de l'ARN	59
4.2.7. Analyse de l'expression génique de l'EGFR par RT-PCR	60
4.2.8. Analyses statistiques	61
4.3. Résultats	62
4.3.1. Caractéristiques des 39 patients	62
4.3.2. Expression protéique de l'EGFR par IHC	63
4.3.3. Nombre de copies de l' <i>EGFR</i> par FISH	65
4.3.4. Mutations de l' <i>EGFR</i> , de <i>KRAS</i> et <i>BRAF</i>	66
4.3.5. Expression génique de l'EGFR (v1-4 et vIII mutant)	66
4.3.6. Relation avec la survie globale et sans progression	68

4.4. Discussion	69
5. Etude de l'EGFR, de MET et d'HER2 dans une série complémentaire de 72 ITACs	72
5.1. Objectifs	72
5.2. Matériels et méthodes.....	72
5.2.1. Patients et prélèvements tissulaires	72
5.2.2. Réalisation des blocs de tissu microarray	73
5.2.3. Analyse de l'expression protéique de l'EGFR, de MET et d'HER2 par IHC.....	73
5.2.4. Analyse du nombre de copies de l'EGFR et de MET par hybridation in situ.....	75
5.2.5. Analyses statistiques.....	76
5.3. Résultats	77
5.3.1. Caractéristiques des 111 patients, synthèse des deux séries.....	77
5.3.2. Expression protéique de l'EGFR, de MET et d'HER2 en IHC, étude des 72 ITACs complémentaires organisés en TMA.....	78
5.3.3. Nombre de copies de l'EGFR et de MET par HIS, étude des 72 ITACs complémentaires organisés en TMA	83
5.3.4 Expression protéique de l'EGFR et nombre de copies de l'EGFR des 111 ITACs, synthèse des deux séries.....	86
5.3.5. Relation avec la survie globale et sans progression, synthèse des deux séries.....	86
5.4. Discussion	88
6. Conclusion.....	93
Bibliographie	95
Figures et tableaux.....	101
Annexes.....	103
Serment d'Hippocrate.....	114

Abréviations

ADN (acide désoxyribonucléique).....	54
ADNc (ADN complémentaire).....	60
ADNg (ADN génomique).....	55
AKT (<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>).....	46
APC (<i>adenomatous polyposis coli</i>).....	45
ATP (adénosine triphosphate).....	56
BRAF (<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>).....	46
CCD (<i>charge coupled device</i>).....	56
CCRs (adénocarcinomes colo-rectaux).....	12
CDX-2 (<i>caudal-related homeobox 2</i>).....	33
CEN 7 (centromère 7).....	54
CHU (centre hospitalo-universitaire).....	21
CK (cytokératines).....	33
DAPI (4',6' di amidino-2-phényl indole).....	54
ddNTP (didésoxyribonucléotide).....	58
DISH (<i>dual in situ hybridization</i>).....	75
dNTP (désoxyribonucléotide).....	56
EGF (<i>epidermal growth factor</i>).....	46
EGFR (<i>epidermal growth factor receptor</i>)....	12
EGFR ^{DEC} (domaine extracellulaire de l'EGFR)	52
EGFR ^{DIC} (domaine intracellulaire de l'EGFR)	52
ERBB2 (<i>v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>).....	50
FISH (<i>fluorescence in situ hybridization</i>).....	52
FITC (fluoréscéine isothiocyanate).....	75
GAP (<i>GTPase activating protein</i>).....	48
GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase).....	60
GDP (guanosine diphosphate).....	48
GEF (<i>G exchange factor</i>).....	48
GTP (guanosine triphosphate).....	48
h (heure).....	30
HER1 (<i>human epidermal receptor 1</i>).....	45
HES (hématéine-éosine-safran).....	21
HGF (<i>hepatocyte growth factor</i>).....	50
HGFR (<i>hepatocyte growth factor receptor</i>)..	50
HIS (hybridation <i>in situ</i>).....	47
HNPCC (<i>hereditary non polyposis colorectal cancer</i>).....	49
HPRT (hypoxanthine phosphoribosyl transférase).....	60
HPS (hématéine-phloxine-safran).....	38
HRM (<i>high-resolution melting</i>).....	57
IARC (<i>international agency for research on cancer</i>).....	41
IHC (immunohistochimie).....	33
IRM (imagerie par résonance magnétique).....	27
ITACs (<i>intestinal type adenocarcinomas</i>)....	12
KRAS (<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>).....	46
LOH (<i>loss of heterozygosity</i>).....	45
MAPK (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)...	46
MDM2 (<i>murine double minute-2</i>).....	49
min (minute).....	23
MMR (<i>mismatch repair</i>).....	45
MSI (instabilité des microsatellites).....	45
n (nombre).....	62
NRAS (<i>neuroblastoma-RAS</i>).....	50
OMS (organisation mondiale de la santé)....	24
ORL (oto-rhino-laryngologique).....	12
PAS (acide périodique de Schiff).....	30
PCR (<i>polymerase chain reaction</i>).....	52
PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase).....	46
POM (plateforme d'oncologie moléculaire).	67
PTCC (<i>papillary tubular cylinder cell</i>).....	30
PTEN (<i>phosphatase homologue to tensin</i>) ...	48
RCP (réunion de concertation pluridisciplinaire).....	40
RIN (nombre d'intégrité des ARN).....	59
rpm (rotation par minute).....	59
RT-qPCR (<i>quantitative reverse transcription PCR</i>).....	52
sec (seconde).....	20
SSC (sodium chloride sodium citrate).....	53
TBP (TATA box binding protein).....	60
TDM (tomodensitométrie).....	27
TGF α (<i>transforming growth factor α</i>).....	46
Tm (température de fusion).....	57
TMA (<i>tissue microarray</i>).....	51, 72
TNM (<i>tumor node metastase</i>).....	39
TP53 (<i>tumor protein 53</i>).....	45
TRITC (tétraméthylrhodamine isothiocyanate)	75
UAR (unité relative arbitraire).....	61
UICC (<i>union for international cancer control</i>)	39
v (variant).....	45

1. Introduction

Les tumeurs malignes des sinus et fosses nasales sont rares et regroupent de nombreuses entités ayant leurs propres caractéristiques cliniques, histologiques et moléculaires. Leurs pronostics sont très disparates et justifient des traitements adaptés¹. Dans 10 % des cas il s'agit d'adénocarcinomes nasosinusiens de type intestinal (ITACs pour *intestinal type adenocarcinomas*)², qui se définissent histologiquement par leurs ressemblances morphologiques et immunophénotypiques avec les adénocarcinomes colo-rectaux (CCRs)³.

Les ITACs sont de localisation préférentielle ethmoïdale³, en rapport étroit avec notamment les orbites ou l'endocrâne. Ils se développent à bas bruit et sont souvent de découverte tardive, à un stade tumoral avancé⁴. Le traitement est le plus souvent chirurgical [à double équipe oto-rhino-laryngologique (ORL) et neurochirurgicale] associé à une radiothérapie complémentaire⁵. Malgré les progrès thérapeutiques, il s'agit de tumeurs de mauvais pronostic, notamment du fait de leur potentiel de récurrence loco-régional³.

Il est bien établi que l'exposition aux poussières de bois est un facteur de risque prépondérant de survenue d'un ITAC⁶. Cependant, les mécanismes de leur oncogénèse sont mal connus et peu étudiés.

En raison des similitudes morphologiques et immunophénotypiques qui existent entre les ITACs et les CCRs, l'hypothèse que ces deux types tumoraux pourraient partager des mêmes mécanismes d'oncogénèse a été avancée. Dans les CCRs, l'activation de la voie de signalisation de l'*epidermal growth factor receptor* (EGFR) joue un rôle important dans la tumorigénèse et la progression tumorale⁷. De plus les patients atteints de CCRs à un stade avancé peuvent bénéficier d'une thérapie ciblée contre l'EGFR⁸, ce qui permet d'améliorer leur survie globale et leur survie sans progression.

L'objectif de notre travail a été d'évaluer l'implication éventuelle de la voie de signalisation de l'EGFR dans l'oncogénèse des ITACs et d'identifier de potentiels marqueurs pronostiques moléculaires.

2. Généralités

2.1. Développement, composition et fonction des cavités naso-sinusiennes

L'appareil respiratoire possède deux constituants fonctionnels principaux, un système de conduction et un système d'échange gazeux. Les cavités naso-sinusiennes en représentent la portion initiale. Elles sont constituées des cavités ou fosses nasales communiquant avec les sinus para-nasaux (sinus maxillaires, frontaux, sphénoïdaux et ethmoïdaux).

2.1.1. Embryogénèse⁹⁻¹²

Le développement de la tête et du cou est marqué par l'apparition de l'appareil branchial. A la fin de la quatrième semaine de développement, l'ébauche de la face est centrée par le stomatodaeum (bouche primitive) qui est limité en haut par le bourgeon frontal et latéralement par la première paire d'arcs branchiaux, ces derniers étant constitués chacun par un bourgeon mandibulaire et maxillaire (**Figure 1**).

Vers la cinquième semaine de développement deux épaissements ectoblastiques du bourgeon frontal donnent les placodes olfactives. Ces dernières s'épaississent en périphérie pour donner les bourgeons nasaux externe et interne, et se creusent au centre pour former les cupules olfactives.

Au cours de la sixième semaine de développement les cupules olfactives vont s'invaginer pour donner les fosses nasales primitives s'ouvrant sur la cavité buccale primitive par les choanes après rupture de la membrane bucco-nasale (**Figure 2**). Dans ce même temps, les bourgeons primordiaux vont se développer et certains vont fusionner. Les bourgeons nasaux externes vont donner la partie externe du nez. Les bourgeons maxillaires et nasaux internes vont donner le massif médian inter-maxillaire (avec ses trois composants : labial, gingival et palais primaire). Par la suite, les processus palatins émanant des bourgeons maxillaires vont fusionner et donner le palais secondaire.

L'ossification du crâne est un processus complexe. Brièvement, le neurocrâne membraneux (os plat) donne notamment naissance à l'os frontal par ossification membraneuse. Le chondrocrâne (base du crâne) donne naissance entre autre au sphénoïde et à l'éthmoïde par ossification enchondrale. Le viscérocrâne (squelette de la face) donne notamment naissance aux maxillaires et mandibules par ossification membraneuse à partir du premier arc branchial.

Les sinus de la face se développent sous forme de diverticules des parois latérales des fosses nasales qui pénètrent le maxillaire, l'éthmoïde, le frontal et le sphénoïde. Ils augmentent de volume jusqu'à la puberté et contribuent de façon importante à la morphologie faciale.

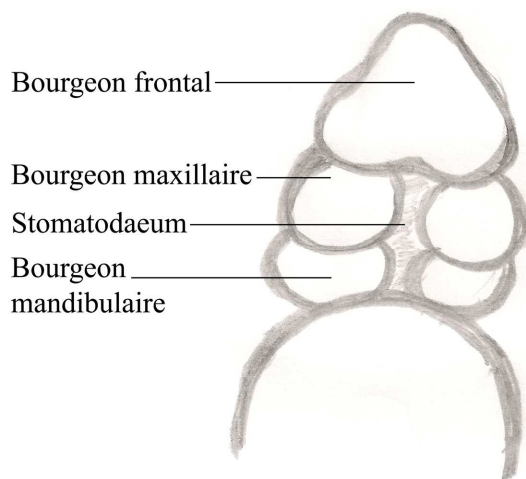


Figure 1. Vue frontale d'un embryon lors de la quatrième semaine de développement, adapté de Langman¹¹.

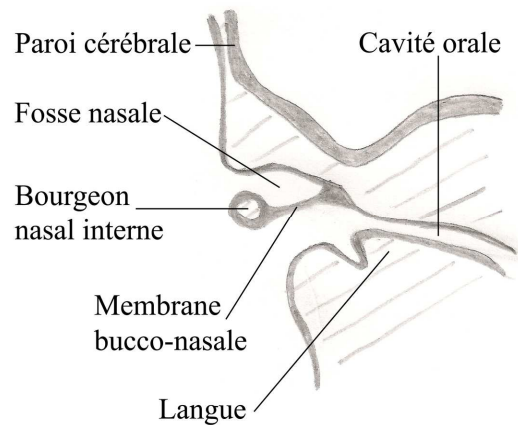


Figure 2. Coupe sagittale schématisée passant par la fosse nasale primitive chez un embryon de six semaines, adapté de Langman¹¹.

2.1.2. Anatomie ^{9,13-17}

Les fosses nasales sont deux cavités paires et centrales du massif facial. Elles sont séparées entre elles par une fine cloison ostéo-cartilagineuse, le septum nasal. Ce dernier est cartilagineux dans sa portion antérieure et osseux dans sa portion postérieure, notamment constituée du vomer séparant les deux choanes, et de la lame perpendiculaire de l'ethmoïde se prolongeant en arrière par la crête antérieure sphénoïdale et en avant par l'épine nasale du frontal. En inférieur, le septum nasal est en rapport avec les crêtes nasales maxillaire et palatine (**Figure 3**).

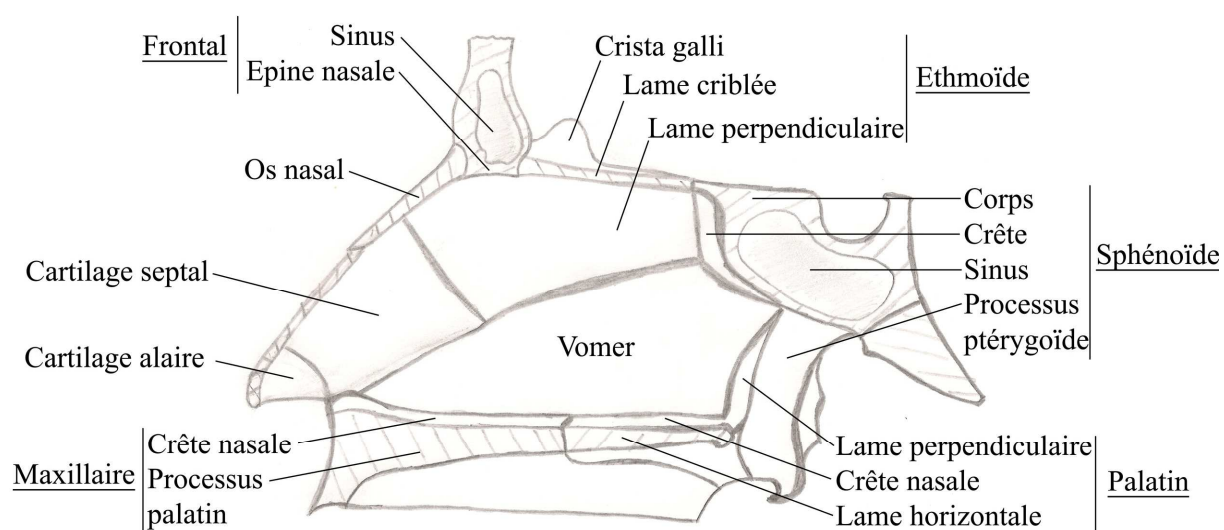


Figure 3. Paroi médiale des fosses nasales (septum nasal), adapté de Netter⁹.

Le toit des fosses nasales est essentiellement constitué par la lame horizontale ou lame criblée de l'ethmoïde. Cette fine paroi osseuse les sépare de l'étage antérieur de la base du crâne. En inférieur, les fosses nasales sont séparées de la cavité buccale par le palais dur se prolongeant en arrière par la face postérieure du voile du palais mou. Les fosses nasales sont ouvertes en avant sur le vestibule nasal par l'orifice piriforme, sur lequel s'insère le squelette cartilagineux du nez. En arrière, elles sont ouvertes sur le nasopharynx par l'intermédiaire des choanes.

La paroi latérale des fosses nasales est constituée de la face médiale du maxillaire, de l'os lacrymal, de la face médiale de l'ethmoïde, de la lame perpendiculaire de l'os palatin et de la lame médiale du processus ptérygoïde du sphénoïde. Cette paroi latérale est irrégulière du fait de la présence de lamelles osseuses convexes en dedans : les cornets nasaux inférieurs, moyens, supérieurs et suprêmes. L'espace entre les cornets et la paroi latérale délimite les méats, au niveau desquels se drainent les sinus para-nasaux et la voie lacrymale (**Figure 4**).

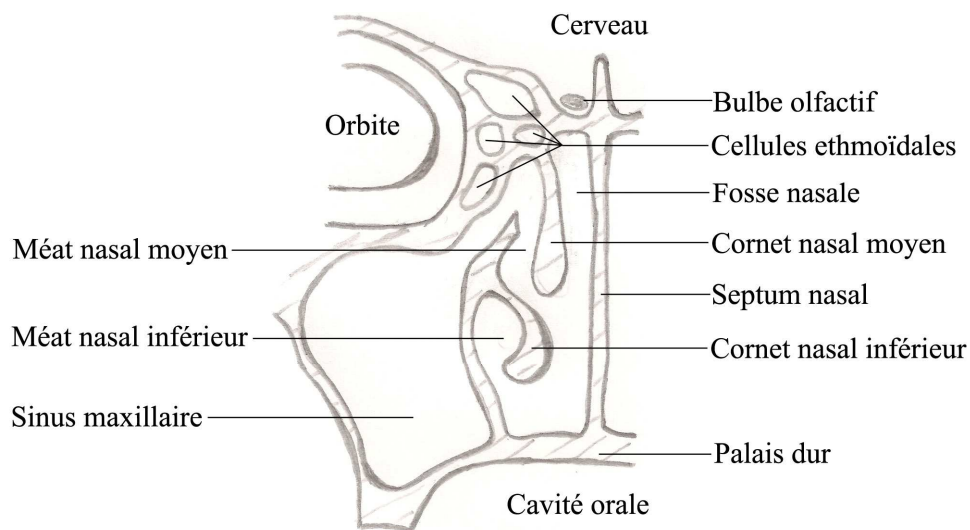


Figure 4. Coupe frontale des fosses nasales, adapté de Netter⁹.

Le cornet inférieur s'articule avec le maxillaire, l'os nasal, le processus unciné de l'ethmoïde et l'os palatin. Le méat inférieur contient l'orifice du canal lacrymo-nasal.

Le cornet moyen appartient à la face médiale de l'ethmoïde et s'articule aussi avec le maxillaire et l'os palatin. Le méat moyen comprend plusieurs reliefs (l'agger nasi, le processus unciné ou unciforme, le hiatus semi-lunaire ou gouttière uncibulaire, la bulle ethmoïdale et la gouttière rétrobulbinaire) et comprend les orifices de drainage des sinus frontaux (canal naso-frontal), des sinus maxillaires et des cellules ethmoïdales antérieures.

Les cornets supérieurs et suprêmes sont inconstants anatomiquement. Leurs méats comprennent l'ouverture des cellules ethmoïdales postérieures. Enfin, l'ostium du sinus sphénoïdal est présent en arrière du cornet supérieur au niveau du récessus sphéno-ethmoïdal.

On distingue quatre paires de sinus para-nasaux creusant des cavités aériques au sein des os ethmoïdes, frontaux, maxillaires et sphénoïde. Ils peuvent être séparés en deux unités, antérieure et postérieure, selon la topographie de leur drainage par rapport à l'insertion ethmoïdale de la lame basale du cornet moyen. Le complexe ostio-méatal antérieur comporte les sinus ethmoïdaux antérieurs, frontaux et maxillaires. Le complexe sphéno-ethmoïdal postérieur comporte les sinus ethmoïdaux postérieurs et sphénoïdes.

Les sinus ethmoïdaux sont présents dès la naissance et ont leur taille adulte vers l'âge de douze ans. L'ethmoïde est un os impair et médian, constitué d'une lame verticale, d'une lame criblée et de deux masses latérales. La lame verticale de l'ethmoïde est divisée par la lame criblée en une partie supérieure endocrânienne, l'apophyse crista galli, et une inférieure, la lame perpendiculaire. La face supérieure de la lame criblée, endocrânienne, correspond aux gouttières olfactives. Les masses latérales de l'ethmoïde sont appendues de chaque côté de la lame horizontale. Les faces supérieures de ces masses latérales s'articulent avec le frontal. A ce niveau on observe deux gouttières contenant les artères ethmoïdales antérieure et postérieure. Leurs faces inférieures et antérieures s'articulent notamment avec le maxillaire. En postérieur, dans leurs moitiés externes, elles s'articulent avec le corps du sphénoïde, et dans leurs moitiés internes elles délimitent un espace, le récessus sphéno-ethmoïdal. Leurs parois externes correspondent à la paroi interne de l'orbite, l'os planum ou la lame papyracée. Enfin, en interne elles constituent en grande partie la face externe des fosses nasales.

Les masses latérales de l'ethmoïde sont creusées de petites cavités aériennes, les cellules ethmoïdales, constituant les labyrinthes ethmoïdaux antérieur et postérieur selon la topographie de drainage. A noter que certaines de ces cellules sont jonctionnelles avec les os de voisinage tel que l'os frontal et le maxillaire.

Les cellules ethmoïdales antérieures s'ouvrent dans le méat moyen. Elles sont constituées de trois systèmes : le système unciforme (antérieur), ethmoïdo-frontal, se drainant dans la gouttière uncibulaire et dont la cellule la plus antérieure correspond à l'agger nasi ; le système méatique ; et le système de la bulle (postérieur), ethmoïdo-maxillaire, se drainant dans la gouttière rétrobulbulaire.

Les cellules ethmoïdales postérieures se drainent dans le méat supérieur. Chez 20 % de la population, il existe une pneumatization de la cellule ethmoïdale la plus postérieure (cellule d'Onodi) pouvant coloniser le sphénoïde et avoir un rapport étroit avec le canal optique.

Les sinus frontaux, dus au développement d'une cellule ethmoïdo-frontale, s'individualisent vers l'âge de huit ans et ont leur taille définitive à l'âge adulte. Ils sont absents chez 5 % de la population et sont asymétriques chez 15 %. Ils creusent l'angle des portions médianes verticale et horizontale de l'os frontal. La portion verticale du frontal représente la paroi antérieure de la fosse crânienne antérieure. La portion horizontale constitue le plancher de la fosse crânienne antérieure, le toit de l'orbite, le toit des sinus ethmoïdaux et s'articule médialement avec la lame criblée. Ces sinus sont drainés au niveau du méat moyen par le canal naso-frontal, s'abouchant à l'extrémité supérieure de la gouttière uncibulaire.

Les sinus maxillaires sont les plus grands. Ils sont présents dès la naissance et augmentent de taille jusqu'à l'âge adulte avec deux périodes d'accélération (0 à 3 ans et 7 à 12 ans). Ils occupent la quasi-totalité de la pyramide maxillaire. La plupart de leurs parois sont fines et translucides. Leur paroi supérieure correspond au plancher de l'orbite, au niveau de laquelle transite le nerf sous orbitaire. Leur paroi inférieure est à proximité de certaines racines dentaires. Leur paroi postérieure correspond à la paroi antérieure de la fosse ptérygo-palatine. Leur ostium de drainage est situé à la partie supérieure de leur face interne, communiquant avec le méat moyen au niveau de l'extrémité inférieure de la gouttière uncibulaire.

Les sinus sphénoïdaux sont les plus médians et postérieurs. Ils sont présents vers l'âge de trois ans et atteignent leur taille définitive vers dix-huit ans. Ils creusent le corps du sphénoïde et se prolongent souvent dans la grande et la petite aile, plus rarement dans le ptérygoïde. Ils sont souvent asymétriques, séparés par un septum inter-sinusien. Ils sont en rapport latéralement avec le nerf optique, le sinus caverneux et le canal carotidien, et en haut avec la selle turcique. Leur ostium de drainage se situe dans le récessus sphéno-ethmoïdal.

La vascularisation des fosses nasales est riche. Elle provient des artères carotides externes et internes.

De la carotide externe émanent notamment les artères maxillaire et faciale. L'artère sphéno-palatine, branche terminale de l'artère maxillaire, se divise en une branche médiale (destinée au septum nasal) et en une branche latérale (vascularisant les cornets inférieurs et moyens). L'artère faciale donne notamment naissance à l'artère labiale supérieure (donnant une branche pour la partie latérale des narines et une branche septale) et à l'artère nasale latérale (destinée à la partie antérieure du nez).

La carotide interne donne notamment naissance aux artères ethmoïdales antérieure et postérieure, par l'intermédiaire de l'artère ophtalmique. L'artère ethmoïdale antérieure vascularise une partie de la région olfactive, de la paroi latérale des fosses nasales, du septum nasal, du sinus frontal et du nez. L'artère ethmoïdale postérieure vascularise une partie des parois latérale et médiale des fosses nasales, les cornets supérieurs et suprêmes et le récessus sphéno-ethmoïdal.

Les branches veineuses des fosses nasales, satellites des artères, gagnent le sinus caverneux, la veine faciale et le plexus ptérygo-maxillaire. A noter, au niveau des cornets, un riche réseau veineux superficiel plexiforme.

Le drainage lymphatique des fosses nasales est peu important. Celui de la partie antérieure se fait vers les ganglions sous-mandibulaires et sous-mentonniers. Celui de la partie postérieure se fait vers les ganglions jugulo-carotidiens supérieurs.

Les fosses nasales sont richement innervées. L'innervation est sensorielle, sensitive et végétative. Elle fait intervenir entre autres le nerf olfactif (I), le nerf ophtalmique (V1), notamment avec ses branches ethmoïdales antérieure et postérieure émanant du nerf nasociliaire, le nerf maxillaire (V2) avec entre autre la branche ptérygo-palatine, et le nerf facial (VII).

2.1.3. Histologie ^{9,12,16,18,19}

La muqueuse des fosses nasales est revêtue d'un épithélium de type respiratoire, pseudo-stratifié, cylindrique cilié (**Figure 5**). Toutes les cellules reposent donc sur la membrane basale sans toutes atteindre la surface. La position variable en hauteur des noyaux donne cet aspect de pseudo-stratification. Quatre types cellulaires principaux sont observés : les cellules cylindriques ciliées, les cellules caliciformes, les cellules à microvillosités et les cellules basales.

Les cellules cylindriques ciliées sont les plus nombreuses. Environ 50 à 200 cils, mesurant chacun 5 à 10 μm de long et 0,3 μm de diamètre, sont présents à leur pôle apical. Ils sont en perpétuel mouvement, environ dix à vingt battements par seconde (sec), même en condition de température extrême. En cas de lésion, leur régénération est rapide.

Les cellules caliciformes sont plus rares, environ une pour quatre à cinq cellules ciliées. Leur pôle apical est distendu par un agrégat dense de granules de mucine, qui lors de leur libération par exocytose se combinent à l'eau pour former du mucus.

Les cellules à microvillosités comportent à leur pôle apical 300 à 400 microvillosités, mesurant 2 μm de long et 0,1 μm de diamètre, augmentant leur surface cellulaire.

Les cellules basales représentent une population de réserve pouvant régénérer les trois autres types cellulaires. Elles sont polyédriques, de petite taille, en situation basale, et sont éparées le long de l'épithélium.

D'autres types cellulaires sont rencontrés plus rarement, tels que des cellules neuro-endocrines ainsi que des mélanocytes.

Le chorion ou lamina propria est d'épaisseur variable. Il contient de nombreuses glandes séreuses et muqueuses. Ce tissu conjonctif est richement vascularisé, particulièrement au niveau des cornets (**Figure 6**). En effet, ces derniers sont le siège d'un réseau veineux riche plexiforme, pseudo-angiomateux, pouvant rapidement se dilater ou se contracter. En condition physiologique, des cellules inflammatoires sont présentes au sein du chorion, incluant des lymphocytes et des plasmocytes. En profondeur le tissu conjonctif devient plus fibreux se rattachant au périchondre et périoste des tissus cartilagineux et osseux de soutien.

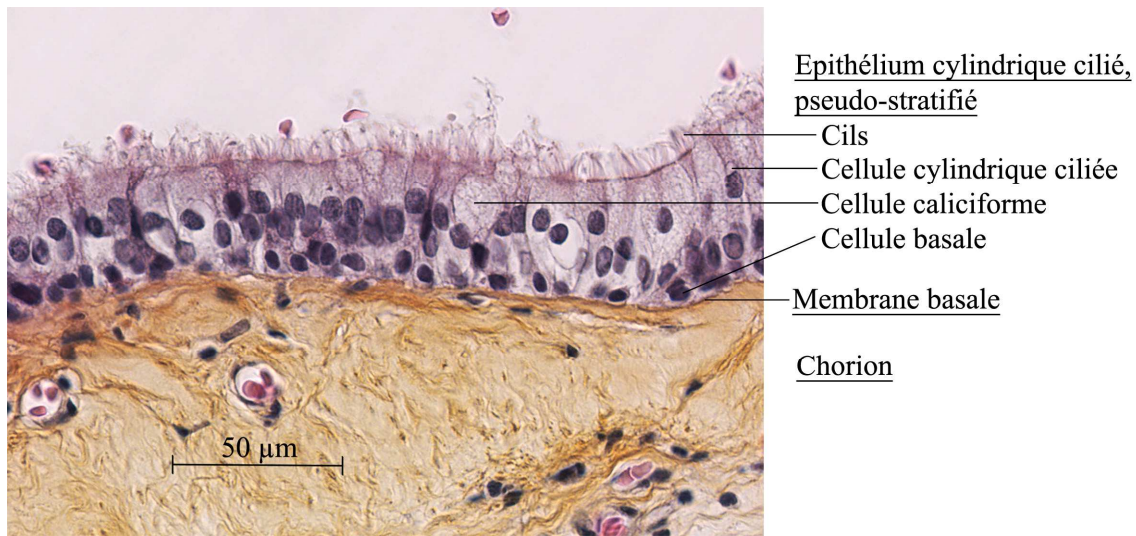


Figure 5. Epithélium respiratoire pseudo-stratifié, cylindrique cilié [hématoxyline-éosine-safran (HES) ; Laboratoire de Pathologie, Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Limoges].

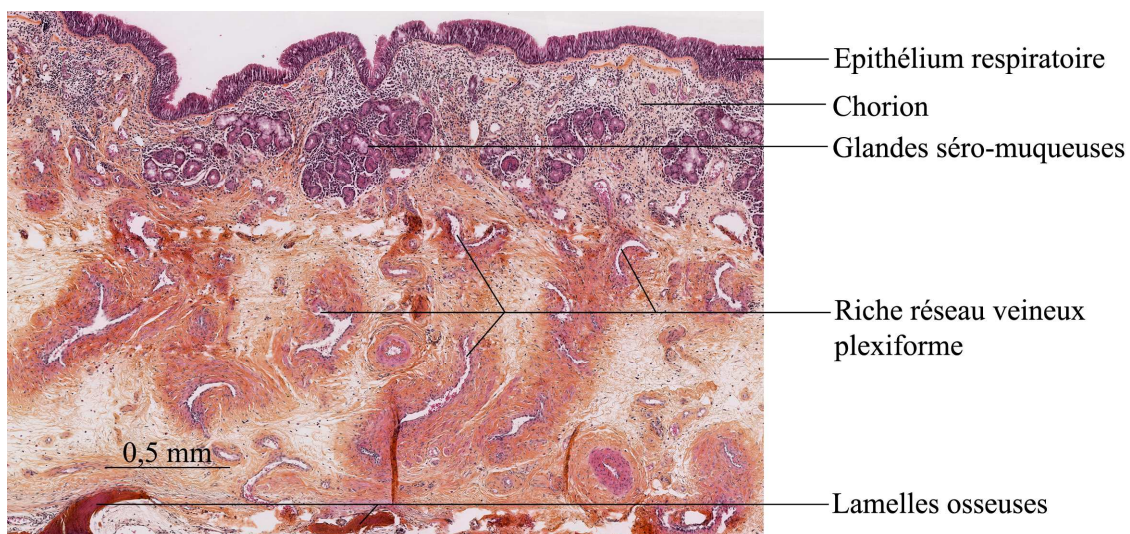


Figure 6. Coupe histologique d'un cornet (HES ; Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

La muqueuse des fosses nasales est en continuité avec celle des sinus para-nasaux par les différents ostia. Dans les sinus cette muqueuse est similaire, cependant plus fine, avec moins de glandes séro-muqueuses et de cellules caliciformes (sauf dans le voisinage des ostia) et moins de vaisseaux.

La muqueuse olfactive est située au niveau de la partie postéro-supérieure des fosses nasales, sur la face inférieure de la lame criblée, de la région supérieure de la cloison nasale et du cornet supérieur. Elle est formée d'un épithélium cylindrique pseudo-stratifié constitué de trois types cellulaires : les cellules neuro-sensorielles olfactives, les cellules de soutien ou sus-tentaculaires, et les cellules basales.

Les cellules neuro-sensorielles olfactives sont des neurones bipolaires, au corps cellulaire fusiforme et au noyau arrondi situé dans la couche moyenne de l'épithélium. Leurs prolongements dendritiques atteignent la surface de l'épithélium et s'y terminent par un renflement muni de six à douze cils olfactifs mesurant 2 μm de long. Leurs prolongements axonaux franchissent la membrane basale et pénètrent dans le chorion où ils forment, en se regroupant entre eux et avec les cellules de schawnn, des filets nerveux myélinisés qui passent la lame criblée pour atteindre le bulbe olfactif.

Les cellules de soutien sont cylindriques hautes avec à leur pôle apical de nombreuses microvillosités qui se mêlent aux cils olfactifs. Leurs cytoplasmes contiennent des pigments de lipofuscine qui donnent une coloration jaune à la muqueuse olfactive.

Les cellules basales sont coniques et sont éparées au sein de l'épithélium. Elles sont à l'origine du renouvellement des cellules de soutien.

Le chorion est un tissu conjonctif lâche parcouru des filets nerveux olfactifs et des glandes séreuses de Bowmann.

2.1.4. Physiologie ^{12,16,18-20}

Les fonctions principales des cavités naso-sinusiennes sont le conditionnement de l'air inspiré (filtration, humidification et réchauffement), la protection et l'olfaction.

Les débits respiratoires représentatifs d'un rythme de repos à ceux d'un effort physique de moyenne intensité sont de l'ordre de 10 à 40 L/min²⁰. Ces flux aériens sont irréguliers et turbulents au sein des fosses nasales du fait des nombreux reliefs anatomiques, ce qui favorise le contact de l'air avec la muqueuse respiratoire et sa couche muco-ciliaire.

Le mucus est produit par les cellules caliciformes et les glandes séro-muqueuses. Il est constitué d'une couche superficielle très épaisse en contact avec la partie distale des cils, et d'une couche profonde aqueuse fluide en contact avec le pôle apical des cellules et la partie proximale des cils. Sa teneur en eau de 95 % est notamment régulée par les transporteurs sodés des cellules à microvillosités. L'humidification de l'air inspiré va se faire notamment par transfert d'eau à partir du mucus sécrété. L'élément organique principal du mucus est représenté par les mucines, glycoprotéines de haut poids moléculaires, créant un réseau macromoléculaire superficiel, ce qui va permettre de piéger certaines particules exogènes et micro-organismes inhalés. D'autres constituants du mucus, sécrétés entre autres par les cellules séreuses et les plasmocytes, vont participer à la protection du fait de leurs activités anti-infectieuses (lysozyme, immunoglobine sécrétoire A, lactoferrine) et de leurs activités anti-oxydantes (lactoferrine, antileucoprotéase). Le mucus est en perpétuel mouvement du fait de l'activité des cils. Sa clairance, de l'ordre de 6 à 10 mm par minute (min), permet son épuration vers le pharynx. La qualité de son drainage est fortement liée à sa composition. La notion de protection tient aussi aux propriétés mécaniques de la barrière épithéliale et à la présence physiologique de cellules inflammatoires dans le chorion (lymphocytes, plasmocytes et histiocytes). Enfin, le riche réseau vasculaire des fosses nasales permet la régulation thermique.

La fonction d'olfaction est initiée par le contact des substances odorantes avec les neurones bipolaires de la muqueuse olfactive, favorisé par le réseau enchevêtré des cils olfactifs et des microvillosités.

2.2. Description des adénocarcinomes naso-sinusiens de type intestinal

Les adénocarcinomes naso-sinusiens sont définis par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme étant des tumeurs épithéliales malignes glandulaires du tractus naso-sinusien à l'exclusion des carcinomes des glandes salivaires³.

Deux catégories sont reconnues : les adénocarcinomes de type intestinal (ITACs pour *intestinal type adenocarcinomas*) et les adénocarcinomes de type non intestinal³.

2.2.1. Epidémiologie

Les tumeurs malignes naso-sinusiennes sont rares, représentant moins de 1 % des cancers toutes localisations confondues, et environ 3 % de ceux de la tête et du cou^{2,3,21}. Leur incidence est de l'ordre de 0,5 à 1 cas pour 100 000 habitants^{2,22}. Il s'agit d'un groupe hétérogène de tumeurs représenté notamment par : les carcinomes épidermoïdes (51,6 %), les adénocarcinomes (12,6 %), les mélanomes (6,6 %), les neuroblastomes olfactifs (6,3 %), les carcinomes adénoïdes kystiques (6,2 %) et les carcinomes indifférenciés (3,1 %)².

Les adénocarcinomes primitifs naso-sinusiens représentent donc le deuxième type de tumeur le plus fréquent dans cette localisation et sont dans leur plus grande majorité des ITACs²². En France, environ 200 nouveaux cas par an sont recensés^{20,23}.

L'âge moyen de diagnostic se situe autour de 60 ans. La grande majorité des cas est découverte entre 40 et 80 ans, avec des extrêmes entre 12 et 86 ans^{3,6}. Il existe une forte prédominance masculine (sex-ratio de l'ordre de 4 à 20)^{24,25}.

2.2.2. Aspects cliniques

Symptomatologie inaugurale

L'examen clinique débute par l'interrogatoire qui précise les antécédents médico-chirurgicaux, les facteurs de risques (notamment un tabagisme, l'exposition aux poussières de bois), le mode de vie et le motif de consultation avec la description des symptômes ressentis. L'examen physique, au travers des étapes d'inspection, de palpation et de percussion, va permettre de rechercher une déformation faciale, d'évaluer les nerfs crâniens (trouble sensitivo-moteur de la face), de réaliser un examen oculaire (évaluation entre autres de l'acuité et du champ visuel), et d'explorer les aires ganglionnaires cervicales.

Les tumeurs naso-sinusiennes sont souvent de découverte tardive lorsque le volume tumoral est déjà important. Cependant, en comparaison des autres tumeurs naso-sinusiennes et notamment avec les carcinomes épidermoïdes, la croissance tumorale des adénocarcinomes semble être plus lente^{6,26}. En plus de cette symptomatologie tumorale de découverte tardive, les signes fonctionnels sont souvent peu ou aspécifiques, entraînant parfois un retard diagnostique⁶. Le délai entre les premiers symptômes et la première consultation spécialisée est dans plus de la moitié des cas supérieur à 6 mois⁴.

Les manifestations cliniques initiales des adénocarcinomes naso-sinusiens sont par ordre de fréquence⁴ : une obstruction nasale (79 %), une épistaxis (51 %), une tumeur visible par la narine (29 %), une rhinorrhée (27 %), une douleur sinusienne (20 %), une exophtalmie (11 %), une diplopie (9 %), une adénopathie cervicale (1 %) et un amaigrissement (0,5 %).

Ces symptômes sont, dans la grande majorité des cas, unilatéraux^{4,6}. Ce caractère unilatéral et la persistance des symptômes doivent faire suspecter et rechercher le diagnostic⁵, surtout lors de l'association d'une obstruction nasale et d'épistaxis²⁷. Les signes ophtalmologiques (exophtalmie, œdème palpébral, diplopie, anomalie du champ visuel) et neurologiques sont de survenue tardive dans l'histoire de la maladie et traduisent un stade tumoral avancé, avec une extension au-delà de l'organe naso-sinusien⁴. Les métastases ganglionnaires et à distance sont rares au moment du diagnostic.

Examen endoscopique

Plusieurs techniques d'exploration optique sont disponibles¹⁵.

La rhinoscopie antérieure et postérieure au miroir de Clark apporte des informations relativement limitées. Cet examen permet une bonne exploration du vestibule nasal, du septum, du cornet inférieur, de l'opercule du cornet moyen, et une exploration plus difficile du cornet supérieur et du rhinopharynx.

La nasofibroscopie est l'examen réalisé le plus souvent lors de la première consultation. Elle permet une bonne analyse de l'ensemble des fosses nasales notamment de la lame des cornets, ainsi que du pharynx et du larynx en cas de nécessité.

Pour effectuer des gestes endoscopiques tels que aspiration et prélèvements biopsiques, il faudra réaliser un examen aux optiques rigides. Là aussi, l'exploration des fosses nasales et du rhinopharynx sera complète au décours des étapes de rhinoscopie antérieure, moyenne et postérieure.

L'aspect macroscopique des adénocarcinomes naso-sinusiens est peu spécifique^{3,6}. Il s'agit le plus souvent d'une lésion tumorale, bourgeonnante, unilatérale, hétérogène, rosée, grisâtre, parfois crouteuse, gélatineuse ou d'aspect nécrotique friable, saignant facilement au contact. Il ne faudra pas méconnaître une lésion sous-jacente à un polype inflammatoire (polype sentinelle).

Le diagnostic repose sur la biopsie qui doit être effectuée après un bilan par imagerie qui précisera le caractère vasculaire de la lésion (risque hémorragique) et nécrotique. La biopsie doit se faire dans des conditions favorables, sous anesthésie locale ou générale dès lors qu'il existe un risque hémorragique ou qu'elle est potentiellement dangereuse (localisation au sphénoïde, au toit des fosses nasales, à l'ethmoïde postérieur)⁵.

2.2.3. Aspects radiologiques

La radiographie standard des sinus n'a aucun intérêt dans le cadre du dépistage, du diagnostic et du bilan d'extension d'une tumeur naso-sinusiennne^{5,6}. Les clichés d'intérêts sont l'incidence face haute ou l'incidence de Blondeau. Les modifications à rechercher sont une lyse osseuse, une opacité irrégulière, une dilatation des cavités.

Le scanner ou tomodensitométrie (TDM) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) sont les deux techniques d'imagerie utilisées conjointement dans l'exploration des cavités naso-sinusiennes en pathologie cancéreuse²⁸. Elles participent à l'évaluation initiale de la taille tumorale, de son extension loco-régionale et à distance (telle que l'orbite, la fosse infra-temporale, la fosse ptérygo-palatine, intra-crânienne, ganglionnaire, pulmonaire), à l'évaluation du risque biopsique (vascularisation tumorale, variantes anatomiques dangereuses telles que la procidence carotidienne), éventuellement à l'appréciation d'un effet thérapeutique et à la surveillance.

Que ce soit au scanner ou à l'IRM, les principales tumeurs naso-sinusiennes bénignes ou malignes n'ont pas de densité ou de signal spécifiques de leur histologie²⁹.

Dans cette indication, le scanner doit être réalisé après injection de produit de contraste iodé, en l'absence de contre-indication. Deux plans de coupes sont nécessaires et complémentaires : un plan transversal (parallèle au palais osseux) et un plan frontal. Les reconstructions bidimensionnelles permettent d'obtenir des sections sagittales et obliques. L'épaisseur des coupes est le plus souvent de 2 à 3 mm. Les filtres dur et mou sont utilisés. La dose d'irradiation est d'environ 3 à 13 mGray par coupe (à noter la dose seuil de 0,5 à 2 Gray favorisant l'apparition d'opacité du cristallin). Le scanner basse dose n'est pas applicable dans cette indication.

Les modifications à rechercher au scanner sont : une opacité tumorale isodense au tissu musculaire, un refoulement des parois osseuses, une ostéocondensation réactionnelle, une ostéolyse.

Le scanner est l'examen le plus performant pour montrer l'atteinte osseuse et notamment préciser la lyse de la lame papyracée, du plancher de l'orbite et de la lame criblée. C'est aussi l'examen de choix pour rechercher des signes d'extensions ganglionnaire et pulmonaire lors d'une acquisition cervico-thoracique.

Les points négatifs du scanner sont : une mauvaise spécificité (en l'absence de critère franc tel qu'une destruction osseuse) comparativement à une atteinte inflammatoire ou rétionnelle³⁰ et une surestimation du volume tumoral et de son extension³¹.

En l'absence de contre-indication une IRM est réalisée. Le protocole technique comprend⁵ : des séquences T2 en écho de spin dans deux plans orthogonaux, une séquence en diffusion, et au moins deux séquences T1 en écho de spin avant puis après injection de produit de contraste (gadolinium).

L'IRM est l'examen de choix pour préciser l'extension tumorale, notamment aux tissus mous, au cône orbitaire et à l'encéphale.

Par rapport au scanner, l'IRM permet de mieux différencier une lésion tumorale d'une lésion inflammatoire ou rétionnelle avec une sensibilité et une spécificité supérieures à 90 %⁶. En effet, la majorité des tumeurs naso-sinusiennes ont un signal intermédiaire en séquence T2 contrairement aux lésions inflammatoires et rétionnelles qui sont en hypersignal T2²⁹ (**Figure 7**). Cette distinction est affinée après injection de produit de contraste⁶.

Les ITACs sont situés préférentiellement au niveau des sinus ethmoïdaux, dans 40 à 80 % des cas^{3,22}. Plus rarement ils siègent au niveau des fosses nasales et des sinus maxillaires. Dans les cas tumoraux avancés il est parfois impossible de situer le site d'origine.

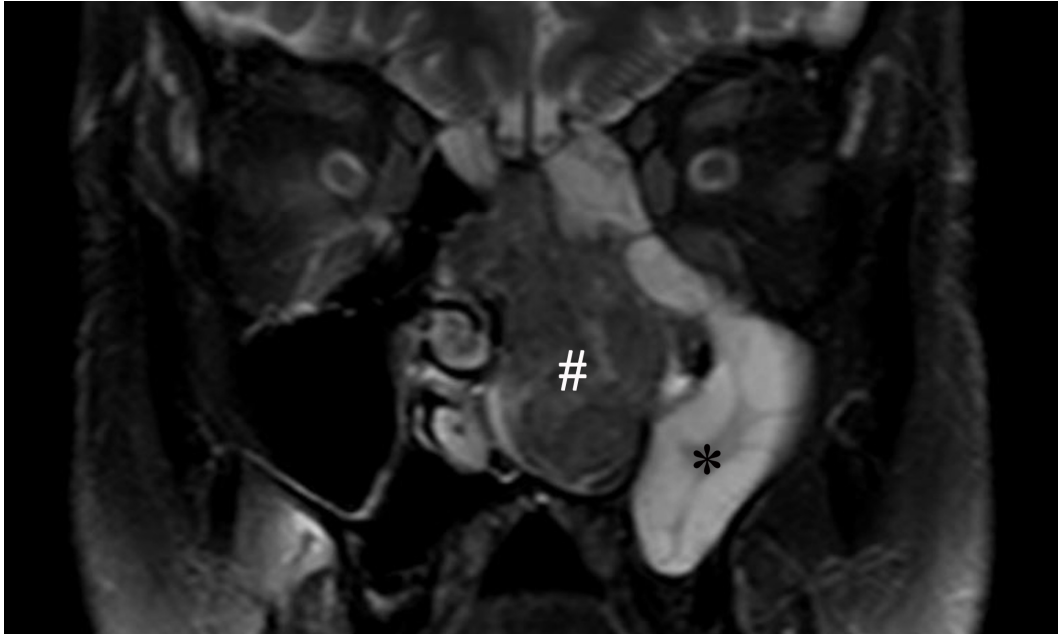


Figure 7. IRM du massif facial (séquence T2, coupe coronale ; Service de Radiologie, CHU de Limoges) d'une volumineuse tumeur ethmoïdo-nasale gauche (#) arrivant au contact du plancher des fosses nasales et de la lame criblée (sans extension endocrânienne), franchissant la ligne septale médiane au-dessus du plan des cornets moyen avec envahissement de l'ethmoïde droit, et respectant les orbites. A noter un aspect rétentionnel du sinus maxillaire gauche (*).

2.2.4. Aspects anatomo-pathologiques

Examen macroscopique

Les pièces d'exérèse sont souvent fragmentées et adressées en plusieurs lots identifiés par site anatomique. Ceci permet en confrontation avec les données endoscopiques, de l'imagerie et chirurgicales, d'établir le stade tumoral en fonction des sites atteints et d'évaluer la qualité d'exérèse.

Comme déjà vu précédemment, l'aspect macroscopique des ITACs est peu spécifique. Il se présente sous la forme d'une masse bourgeonnante, hétérogène, rosée, grisâtre, friable (**Figure 8**).

Lors de la réception des prélèvements en cas de matériel tumoral identifiable et suffisant, est réalisée une cryopréservation tumorale par immersion dans de l'azote liquide et conservation à -140°C.

Après fixation au formol à 10 % pendant 12 à 24 heures (h), les prélèvements sont la plupart du temps inclus en totalité ou largement échantillonnés en cas de volumineuse tumeur. Après déshydratation, imprégnation et inclusion en paraffine, des coupes de 4 à 5 µm sont réalisées et colorées à l'HES, ainsi qu'à l'acide périodique de Schiff (PAS) et au bleu alcian sur un bloc tumoral.

Examen microscopique

L'OMS définit les ITACs comme des adénocarcinomes primitifs naso-sinusiens ressemblant histologiquement à un adénocarcinome (**Figure 9**) ou à un adénome colo-rectal, voir exceptionnellement à une muqueuse normale de type grêle³.

De nombreuses classifications histologiques ont été proposées³²⁻³⁷. Deux d'entre elles ont été retenues par l'OMS, celle de Kleinsasser et Schroeder³³ et celle de Barnes³². Ces deux classifications sont assez superposables. Elles reposent sur la différenciation tumorale et la présence d'un contingent mucineux.

La classification de Kleinsasser et Schroeder décrit six catégories : les adénocarcinomes tubulo-papillaires à cellules cylindriques (PTCC pour *papillary tubular cylinder cell*) bien, moyennement et peu différenciés (respectivement type I, II et III), les adénocarcinomes alvéolaires à cellules caliciformes, les adénocarcinomes à cellules en bague à chaton et les adénocarcinomes transitionnels.

La classification de Barnes reprend les mêmes catégories tout en réunissant le groupe alvéolaire à cellules caliciformes et le groupe à cellules en bague à chaton en un type mucineux (**tableau 1**).

Tableau 1. Classification des sous-types histologiques des ITACs selon les classifications de Barnes³² et Kleinsasser³³.

Barnes	Kleinsasser et Schroeder	Répartition³
Papillaire	PTCC-I	18 %
Colique	PTCC-II	40 %
Solide	PTCC-III	20 %
Mucineux	Alvéolaire à cellules caliciformes A cellules en bague à chaton	
Mixte	Transitionnel	



Figure 8. Aspect macroscopique d'un ITAC (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

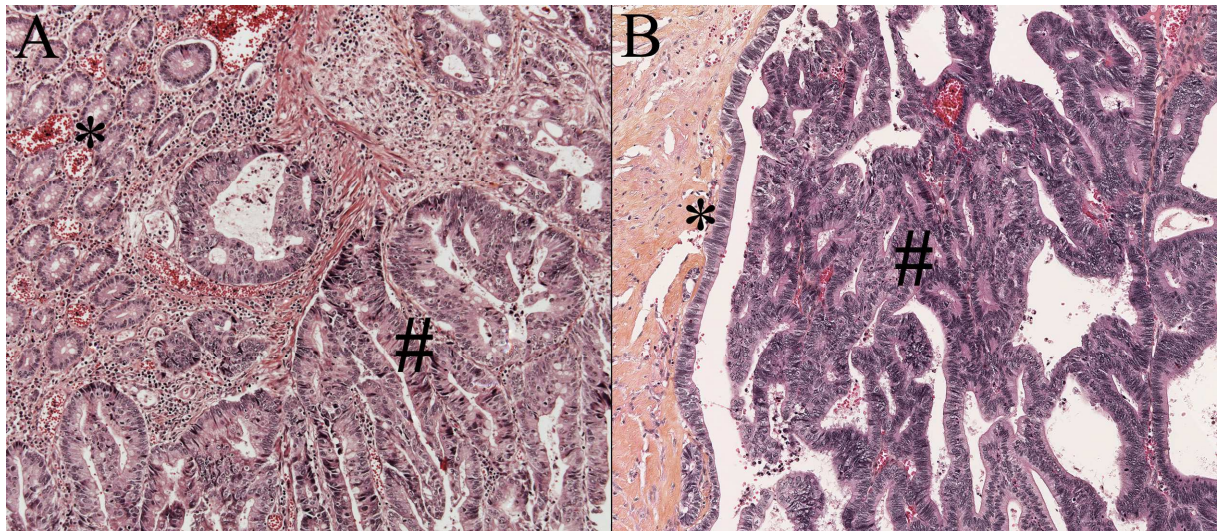


Figure 9. Aspects morphologiques similaires d'un CCR moyennement différencié (A#) et d'un ITAC de sous-type colique (B#). A noter les muqueuses non tumorales colique (A*) et respiratoire (B*), (HES x100 ; Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

Pour des raisons de simplicité, la classification de Barnes est la plus utilisée.

Le sous-type papillaire rappelle les adénomes tubulo-villeux colo-rectaux. L'architecture est majoritairement papillaire avec occasionnellement quelques glandes. Les atypies cyto-nucléaires sont légères, et il existe peu de mitose.

Le sous-type colique, le plus fréquent, est d'architecture majoritairement glandulaire avec de nombreux massifs cribriformes. Quelques papilles sont parfois présentes. Le pléomorphisme nucléaire est modéré avec des mitoses plus nombreuses.

Le sous-type solide est peu différencié, d'architecture massive et trabéculaire, avec de rares formations glandulaires. Les atypies cyto-nucléaires sont plus marquées avec des noyaux vésiculeux, souvent nucléolés. De nombreuses mitoses sont présentes.

Comme certains CCRs, les ITACs peuvent être mucineux. Ce sous-type comprend deux aspects morphologiques pouvant s'observer dans une même tumeur. L'un est fait de cellules en bague à chaton, au sein d'une matrice mucineuse, organisées en petits massifs, en glandes éparses, en micro-papilles avec ou sans axe conjonctivo-vasculaire, ou isolées. L'autre aspect est fait de grandes glandes, séparées entre-elles par de fins septas fibreux et dilatées par des sécrétions mucoïdes abondantes, créant un aspect alvéolaire. Les cellules tapissant ces cloisons alvéolaires sont principalement de type caliciforme (*goblet cells*) ou cuboïde.

Enfin le sous-type mixte correspond à un mélange de deux ou plus des catégories précédentes.

Exceptionnellement les ITACs peuvent reproduire une muqueuse normale de type grêle avec des villosités revêtues d'entérocytes et de cellules caliciformes, des cellules de Paneth en profondeur, et même une musculaire muqueuse³.

Examen immunohistochimique

L'immunohistochimie (IHC) est une technique de routine, automatisée et réalisée quotidiennement dans les laboratoires de Pathologie. Elle consiste à réaliser sur coupe en paraffine une réaction anticorps primaire / antigène, avec amplification du signal par l'utilisation d'anticorps secondaires et révélation par un chromogène.

Les cytokératines (CK) entrent dans la constitution des filaments intermédiaires des cellules épithéliales et ont une expression associée à la différenciation cellulaire³⁸.

L'épithélium respiratoire est de phénotype CK7+ / CK20- contrairement au revêtement colo-rectal qui est CK7- / CK20+ (**Figure 10**).

Les cellules tumorales conservent classiquement leur phénotype d'origine sauf en cas de dédifférenciation. Les CCRs sont habituellement de phénotype CK7- / CK20+ (**Figure 10**).

Les ITACs, en plus de leur ressemblance histologique, présentent un immunophénotype similaire aux CCRs (**Figure 10**). En effet, ils expriment classiquement la CK20, tandis que l'expression de la CK7 est variable (43 % à 93 % des cas)^{3,39}.

D'autres marqueurs de type intestinal sont exprimés par les ITACs, tels que le *caudal-related homeobox 2* (CDX-2) et la villine. Le premier correspond à un facteur de transcription spécifique de la lignée intestinale, codé par le gène homeobox *CDX-2*, impliqué dans sa prolifération et dans sa différenciation. Le second correspond à une protéine du cytosquelette requise dans la formation des microvillosités, ces dernières étant notamment observées au niveau des cellules épithéliales digestives.

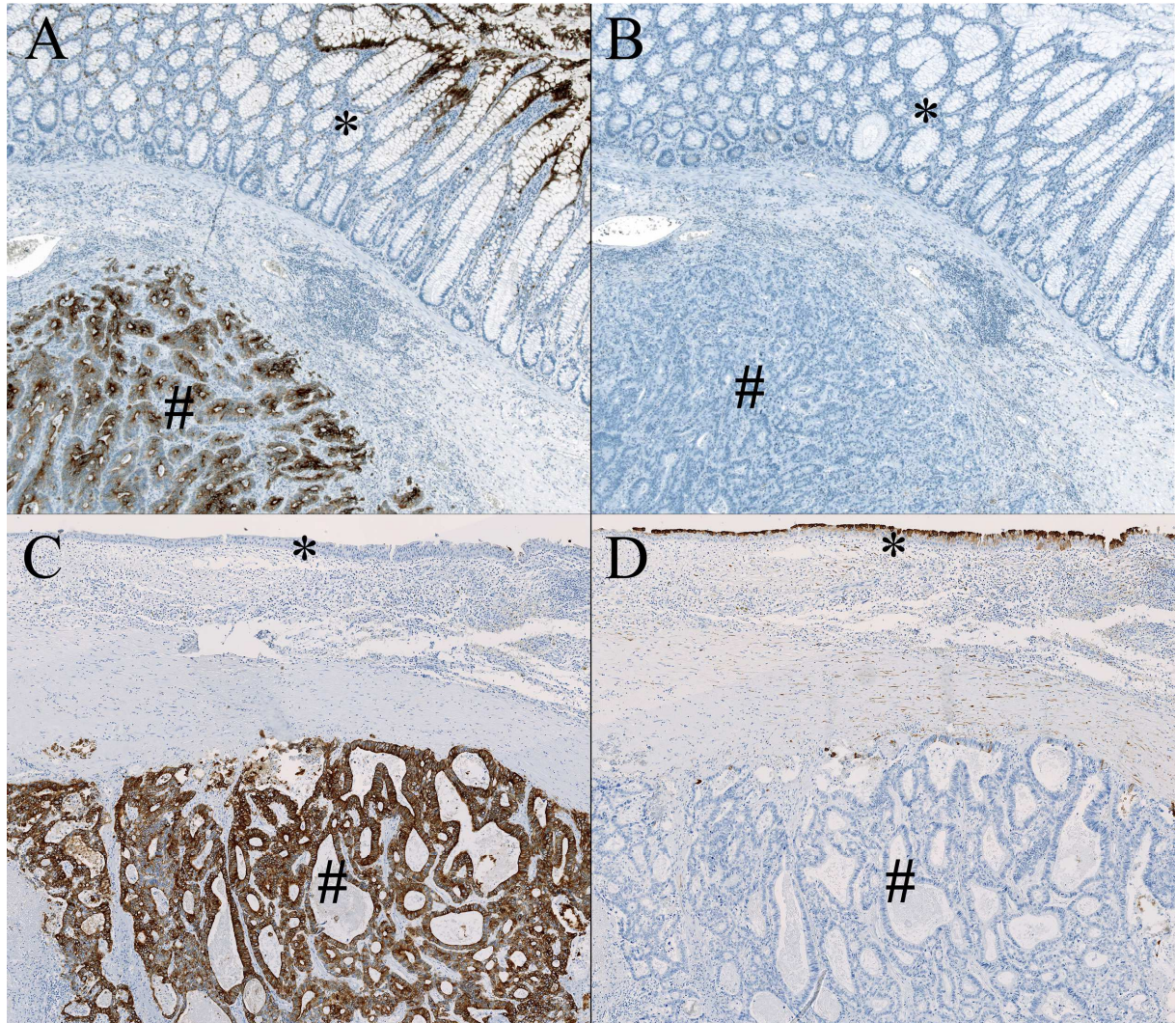


Figure 10. Immunophénotypes similaires de l'épithélium colique normal [CK20+ (A*) / CK7- (B*)], d'un CCR [CK20+ (A#), CK7- (B#)] et d'un ITAC [CK20+ (C#), CK7- (D#)], contrairement à l'épithélium respiratoire [CK20- (C*), CK7+ (D*)], (IHC x50 ; Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

Diagnostic différentiel^{3,22,24,40} (Figure 11)

Le diagnostic différentiel des ITACs se pose avec d'autres tumeurs primitives du tractus naso-sinusien malignes (telles que les adénocarcinomes de type non-intestinal, certaines tumeurs des glandes salivaires, les exceptionnels carcinomes adéno-squameux dans cette localisation et certaines variantes rares de neuroblastomes olfactifs) ou bénignes (telles que les papillomes schneidériens inversés et les hamartomes respiratoires adénomatoïdes) et enfin avec les rares métastases d'un adénocarcinome.

Les adénocarcinomes naso-sinusiens de type non-intestinal sont des adénocarcinomes qui n'ont pas la morphologie des ITACs ou des tumeurs des glandes salivaires. Minoritaires par rapport aux ITACs, ils sont séparés histologiquement en tumeur de bas et de haut grade.

Le diagnostic différentiel avec les ITACs se pose principalement en cas d'adénocarcinome de type non-intestinal, de bas grade. En moyenne l'âge de présentation est de 53 ans (extrêmes entre 9 et 80 ans). Par ordre de fréquence, ils sont localisés au niveau des sinus ethmoïdaux (fréquence moindre que les ITACs), des fosses nasales et des sinus maxillaires. Contrairement aux ITACs il n'existe pas de facteur de risque connu. Leur architecture est variable : tubulaire, tubulo-papillaire ou solide, parfois avec remaniements kystiques. A la différence des ITACs, ils sont caractérisés par une cytologie cubique ou cylindrique basse (revêtement uni-stratifié) et régulière (noyaux ronds, en position basale, atypies légères). Leur immunophénotype est de type respiratoire (CK20- / CK7+ / CDX-2- / villine-).

Les tumeurs des glandes salivaires du tractus naso-sinusien sont rares. Les plus fréquentes d'entre elles sont représentées par les carcinomes adénoïdes kystiques.

Les carcinomes adénoïdes kystiques siègent préférentiellement au niveau des sinus maxillaires et des fosses nasales. L'architecture peut être cribiforme, tubulaire ou solide. Il existe un stroma hyalin, mucineux ou myxoïde. De nombreux engainements péri-nerveux sont fréquemment observés. Les cellules tumorales sont de deux types : canalaire et myoépithéliales, ces dernières ayant de manière caractéristique un noyau hyperchromatique et anguleux.

Les carcinomes muco-épidermoïdes se développent à partir des canaux des acini séro-muqueux des glandes salivaires. Ils sont constitués de trois types cellulaires intriqués entre eux : épidermoïde, intermédiaire et à mucus. L'architecture est variable, macro- ou micro-kystique et solide. La kératinisation est rare.

Les autres tumeurs des glandes salivaires, rapportées dans le tractus naso-sinusien, pouvant être discutées sont : l'adénocarcinome à cellules acineuses, l'adénocarcinome à cellules basales, l'adénocarcinome polymorphe de bas grade, le carcinome *ex* adénome pléomorphe.

Les carcinomes adéno-squameux, correspondant à un sous-type de carcinome épidermoïde, se développent à partir du revêtement de surface. Ils sont exceptionnels en localisation naso-sinusienne. Ils sont associés à l'exposition au tabac. Histologiquement, ils sont constitués d'un contingent de type épidermoïde souvent bien différencié et kératinisant, associé à un contingent adénocarcinomateux plutôt observé en profondeur. A proximité il existe des lésions de carcinome épidermoïde *in situ*. L'immunophénotype du contingent glandulaire est de type respiratoire (CK7+ / CK20-).

Les neuroblastomes olfactifs ou esthésioneuroblastomes olfactifs se développent à partir de la muqueuse olfactive. En moyenne, l'âge de présentation est de 53 ans. Aucun facteur de risque n'a été identifié. Il s'agit d'une tumeur faite de lobules de cellules rondes, cernés par des cellules de type sustentaculaire, et disposés dans un fond fibrillaire. Des rosettes de type Homer-Wright (pseudo-rosettes) ou de type Flexner-Wintersteiner (rosettes neurales) sont parfois présentes. Le grade est variable. La possibilité d'une différenciation adénocarcinomateuse fait discuter ce diagnostic.

Les papillomes schneidériens sont des tumeurs bénignes fréquentes, de trois types : inversé, oncocytaire ou exophytique. Les premiers peuvent éventuellement se discuter du fait de leur architecture et de leur potentiel de transformation carcinomateuse.

Les papillomes inversés sont observés principalement entre 40 et 70 ans, au niveau du mur latéral des fosses nasales. Ils sont constitués d'une invagination d'un épithélium pluristratifié de type transitionnel ou malpighien. Des cellules mucosécrétantes et micro-kystes intraépithéliaux sont présents. Des polynucléaires neutrophiles sont souvent en exocytose formant des micro-abcès. Dans 10 à 20 % des cas ils sont le siège d'une transformation carcinomateuse (plutôt de type épidermoïde mais parfois adénocarcinomateuse).

L'hamartome épithélial respiratoire adénomatoïde s'observe préférentiellement chez l'homme de 58 ans au niveau de la portion postérieure du septum nasal. Il s'agit d'une lésion polypoïde, d'architecture lobulaire, faite de glandes ramifiées revêtues d'un épithélium respiratoire et reposant sur une membrane basale hyalinisée. Ces glandes sont souvent en continuité avec quelques glandes séro-muqueuses.

Les métastases naso-sinusiennes sont rares et siègent préférentiellement au niveau du sinus maxillaire. Elles sont principalement d'origine rénale, plus rarement d'origine pulmonaire, mammaire, thyroïdienne et prostatique³.

Les métastases naso-sinusiennes d'un adénocarcinome colo-rectal sont exceptionnelles. Cependant le diagnostic histologique entre ces deux tumeurs étant impossible, il conviendra en cas de découverte d'ITAC, et surtout en l'absence d'exposition aux poussières de bois, de réaliser une exploration endoscopique colo-rectale.

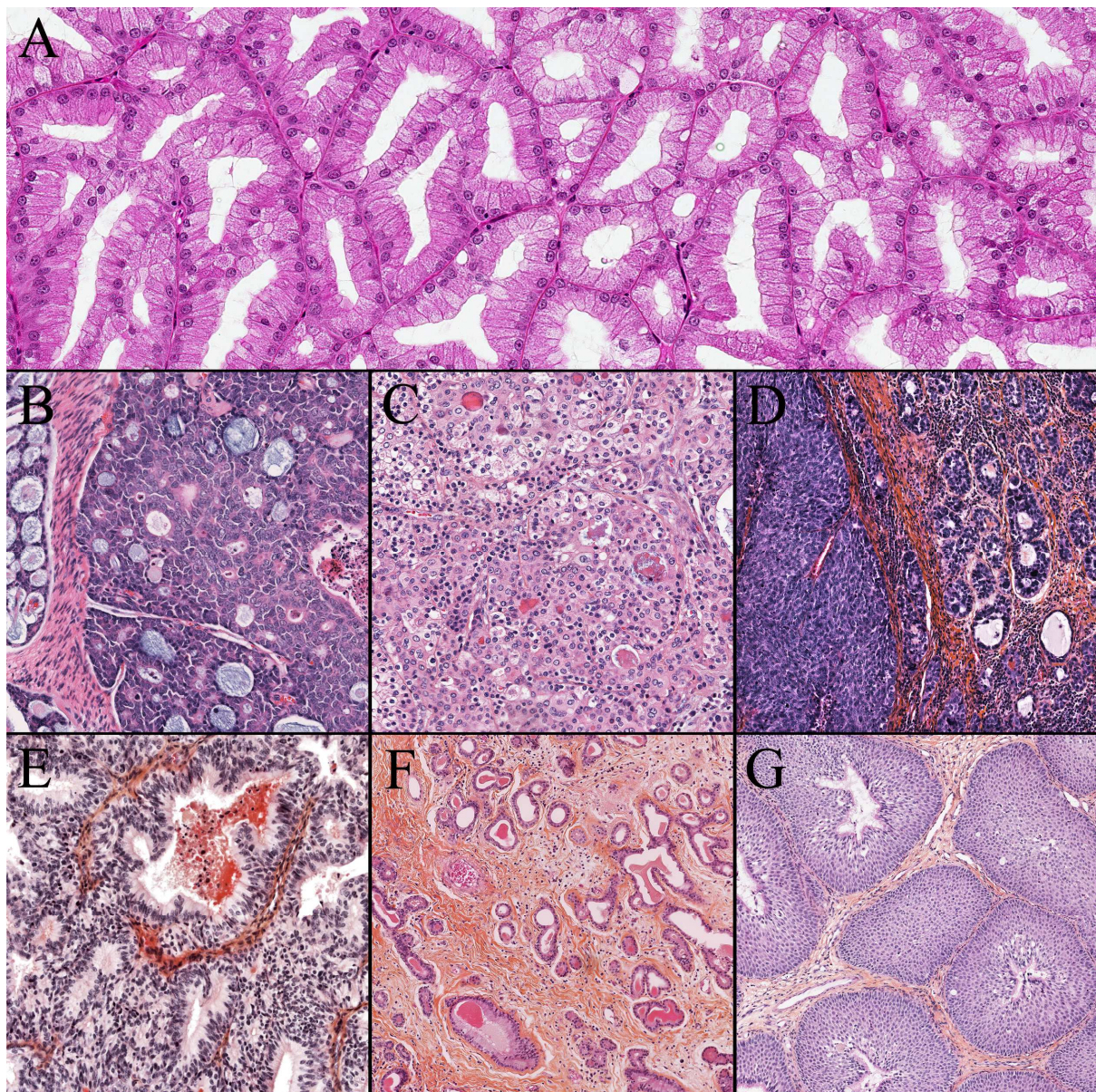


Figure 11. Exemples de diagnostics différentiels histologiques des ITACs : adénocarcinome naso-sinusien de type non-intestinal [A ; hématoxyline-phloxine-safran (HPS) x200 ; Laboratoire de Pathologie, CHU de la Timone, Marseille], tumeurs des glandes salivaires (B : carcinome adénoïde kystique ; C : carcinome muco-épidermoïde ; HES x200 ; Laboratoire de Pathologie, CHU Toulouse Rangueil), carcinome adéno-squameux (D), contingent adénocarcinomateux d'un neuroblastome olfactif (E), hamartome épithélial respiratoire adénomatoïde (F) et papillome schneidérien inversé (G), (D, E, F et G ; HES x100 ; Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

2.2.5. Stade tumoral

L'évaluation de l'extension tumorale intègre les données cliniques, de l'imagerie, chirurgicales et histopathologiques.

Différentes classifications existent, comme celle de l'université de Floride⁴¹, celle de Roux⁵ et la classification *Tumor Node Metastase* (TNM) 2009 de l'*Union for International Cancer Control* (UICC)⁴² (**Tableau 2**).

Tableau 2. Classification TNM 2009 de l'UICC des carcinomes naso-sinusiens⁴².

Topographie	Cavité nasale / sinus ethmoïde	Sinus maxillaire
T1	Tumeur limitée à une sous-unité des cavités nasales ou du sinus ethmoïdal, avec ou sans invasion osseuse.	Tumeur limitée à la muqueuse sans érosion et destruction osseuse.
T2	Tumeur infiltrant deux sous-unités d'un ou plusieurs sites du complexe naso-ethmoïdal, avec ou sans invasion osseuse.	Tumeur avec érosion ou destruction osseuse incluant l'extension au palais dur et/ou au méat moyen, sans atteinte du mur postérieur du sinus maxillaire et des lames ptérygoïdes.
T3	Tumeur infiltrant le plancher ou le mur médian de l'orbite, le sinus maxillaire, le palais ou la lame criblée.	Tumeur infiltrant l'os du mur postérieur du sinus maxillaire, les tissus sous-cutanés, le plancher ou le mur médian de l'orbite, la fosse ptérygoïde, le sinus ethmoïdal.
T4a	Tumeur infiltrant le contenu antérieur de l'orbite, la peau du nez ou des joues, la fosse crâniale antérieure, la lame ptérygoïde, les sinus frontaux ou sphénoïdaux.	Tumeur infiltrant le contenu antérieur de l'orbite, la peau des joues, la lame ptérygoïde, la fosse infratemporale, la lame criblée, les sinus frontaux ou sphénoïdaux.
T4b	Tumeur infiltrant l'apex orbitaire, le cerveau, la fosse crâniale moyenne, les nerfs crâniens autres que le V2, le nasopharynx, ou le clivus.	Tumeur infiltrant l'apex orbitaire, le cerveau, la fosse crâniale moyenne, les nerfs crâniens autres que la division maxillaire du V2, le nasopharynx, ou le clivus.
N0	Absence de métastase ganglionnaire	
N1	Métastase dans un ganglion homolatéral (incluant les médians) ≤ 3 cm	
N2a	Métastase dans un ganglion homolatéral > 3 cm et ≤ 6 cm	
N2b	Métastase dans plusieurs ganglions homolatéraux ≤ 6 cm	
N2c	Métastase ganglionnaire bilatérale ou controlatérale ≤ 6 cm	
N3	Métastase dans un ganglion > 6 cm	
M0	Absence de métastase à distance	
M1	Présence de métastase à distance	

Beaucoup de tumeurs, au moment du diagnostic, sont de stade tumoral avancé (T3 et T4)^{4,6}. Les métastases ganglionnaires sont rares au moment du diagnostic. Les métastases à distance sont encore plus rares et sont, par ordre de fréquence, cérébrales, osseuses, pulmonaires et hépatiques⁶.

2.2.6. Pronostic, traitement, évolution et surveillance

La survie globale à cinq ans est de 40 à 80 %^{3,6,43}. Elle est influencée par le stade TNM^{4,25,44,45} (survie à cinq ans de 92 % pour les stades T1 et T2, de 86 % pour le stade T3, de 53 % pour le stade T4a et de 0 % pour le stade T4b)⁶, par le contrôle local de la maladie^{43,46} et par son évolution.

Le pronostic est principalement lié aux récurrences locales^{5,6,43}. Elles sont observées, au cours de l'évolution de la maladie, dans 30 à 50 % des cas^{3,25,47}, contrairement aux métastases ganglionnaires et à distance observées dans moins de 10 % des cas²⁵. Ces récurrences surviennent en moyenne dans les 18 premiers mois⁴⁸ et siègent le plus souvent au pourtour des berges de la zone d'exérèse : base du crâne, sinus sphénoïdal, péri-orbite. Au moment du diagnostic, la présence d'une extension tumorale méningée, cérébrale ou sphénoïdale est un facteur de récurrence locale⁴⁶. En cas d'évolution locale la survie moyenne est de 29 mois⁴⁹. En cas d'évolution métastatique à distance, elle est de cinq mois⁶.

Les classifications histopathologiques selon la différenciation tumorale et la présence d'un contingent mucineux ont une valeur pronostique^{37,44,45}. En effet, la survie globale à trois ans est grevée par la dédifférenciation et la présence d'un contingent à cellules en bague à chaton (82 % dans le sous-type papillaire, 54 % dans le sous-type colique, 36 % dans le sous-type solide et 0 % dans le sous-type mucineux avec cellules en bague à chaton)³.

Dans ces tumeurs rares, la décision thérapeutique doit être prise en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP). Le traitement est fonction de l'état général du patient et du stade tumoral.

La chirurgie d'exérèse macroscopique complète, avec marges de sécurité, suivie d'une radiothérapie sur le lit tumoral est le traitement standard à visée curatrice⁵.

Les voies d'abord chirurgicales varient avec la localisation de la tumeur et son stade.

L'exérèse des tumeurs de stade avancé (avec envahissement de la lame criblée et/ou de l'étage antérieur de la base du crâne : T3/T4) nécessite préférentiellement un abord mixte transfacial et transcrânien, à double équipe ORL et neurochirurgicale⁶. Cet abord permet un meilleur contrôle des limites de résection et notamment de l'extension méningée.

Les tumeurs de stade moins avancé peuvent bénéficier d'une exérèse par voie ORL transfaciale (para-latéro-nasale ou *degloving*) ou éventuellement par voie endoscopique endonasale.

Si le patient présente un envahissement ganglionnaire clinique ou à l'imagerie, un curage ganglionnaire est recommandé⁵.

La radiothérapie post-opératoire par technique conformationnelle en trois dimensions est un standard. Elle peut être facultative en cas de petite tumeur T1 ou T2 d'exérèse complète, large. En cas de curage ganglionnaire positif une irradiation post-opératoire est recommandée⁵.

L'intérêt d'une chimiothérapie néo-adjuvante ou adjuvante n'est pas établi. En cas de tumeur non résécable un traitement par chimiothérapie (à base de sel de platine) et radiothérapie (concomitante ou non) est discuté au cas par cas en RCP.

La surveillance est clinique (recherche de signe d'appel, palpation des aires ganglionnaires et examen endoscopique après décroustage) et paraclinique (scanner et/ou IRM). Le rythme de surveillance ne fait pas l'objet d'un consensus. Il sera rapproché les deux premières années puis espacé en l'absence de signes d'appels. Il apparaît souhaitable de réaliser un examen post-thérapeutique à trois mois qui fera office d'imagerie de référence⁵.

Lors d'une récurrence, la chirurgie de rattrapage est recommandée en cas de possibilité d'exérèse complète au large, après discussion en RCP. L'intérêt d'un complément de radiothérapie et/ou d'une chimiothérapie n'est pas établi.

2.2.7. Facteurs de risque, physiopathologie et prévention

Le lien de causalité entre l'exposition aux poussières de bois et l'apparition d'adénocarcinomes naso-sinusiens est bien établi par de nombreuses études et a été évoqué dès 1923^{4,6}. En 1995, le centre international de recherche sur le cancer (IARC pour *international agency for research on cancer*) conclut à un effet carcinogène des poussières de bois⁵⁰. Ces dernières viennent au deuxième rang des agents cancérogènes professionnels, derrière l'amiante, en termes de nombre de cancers induits et reconnus comme maladie professionnelle⁶.

Le risque de développer un tel cancer chez les travailleurs du bois, par rapport à la population générale, est multiplié par dix à plus de 100²¹. Il est relatif à l'intensité, à la durée de l'exposition et à la latence (délai entre les premiers symptômes et le diagnostic)⁶. En effet, des excès de risque sont observés pour une concentration atmosphérique de poussière de bois supérieure à 1 mg/m³, pour une exposition au moins égale à un an et pour une latence de plus de 20 ans. Le temps d'exposition est de plus de 5 ans dans 90 % des cas, avec des extrêmes allant de un an à plus de 50 ans⁶. Le temps de latence est en moyenne de 40 ans avec des extrêmes allant de sept ans à plus de 50 ans⁶. Au total, plus de 80 % des adénocarcinomes naso-sinusiens sont dus aux poussières de bois²⁰.

Malgré cette association bien établie, les mécanismes physiopathologiques sont peu connus. Moins de 10 % des poussières de bois auraient un diamètre inférieur à 10 µm. Ces particules, lorsqu'elles ne sont pas arrêtées par la valve nasale, suivent les courants aériens principaux et se déposent de part et d'autre du cornet moyen, notamment au niveau de la fente olfactive et du récessus ethmoïdo-sphénoïdal²⁰. La répartition de ce dépôt semble superposable aux différentes bases d'implantation des adénocarcinomes naso-sinusiens²⁰.

Ce dépôt entraînerait une irritation et une inflammation chronique de la muqueuse respiratoire avec pour conséquence l'apparition de métaplasies épithéliales^{20,51,52}. La diminution de la clairance muco-ciliaire et de l'épuration des particules carcinogènes pérenniserait le processus⁵².

Certains auteurs ont insisté sur l'importance de l'acquisition précoce d'un phénotype intestinal dans l'oncogenèse des ITACs^{39,53} (**Figure 12**), du fait de la présence de lésion de métaplasie intestinale de l'épithélium respiratoire dans 8 à 50 % des patients atteints d'ITAC^{22,51} (**Figure 13**).

Les bois les plus incriminés sont les bois durs (chêne, hêtre, châtaignier) et les bois exotiques. Cependant le risque d'exposition aux bois tendres, plus incertain, ne doit pas être écarté⁶. Parmi les constituants des bois, plusieurs sont potentiellement carcinogènes tels que les composés phénoliques (tanins, diméthoxybenzoquinone, aldéhyde...)⁶. Le principal agent causal retenu est le tanin. Leur action carcinogène serait probablement potentialisée par d'autres composés comme les colles, les résines et les solvants²².

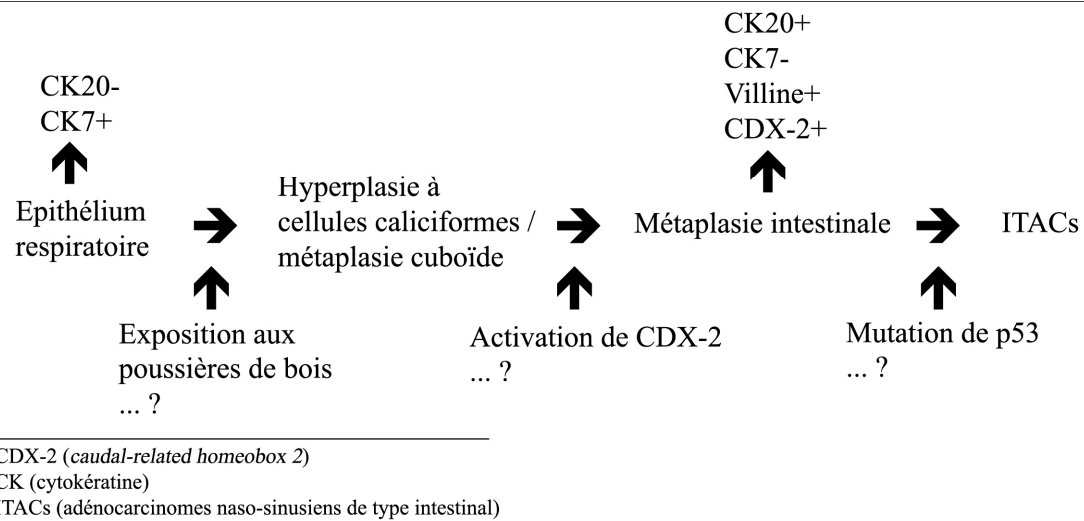


Figure 12. Hypothèses physiopathologiques de la tumorigenèse des ITACs selon Kennedy et al³⁹.

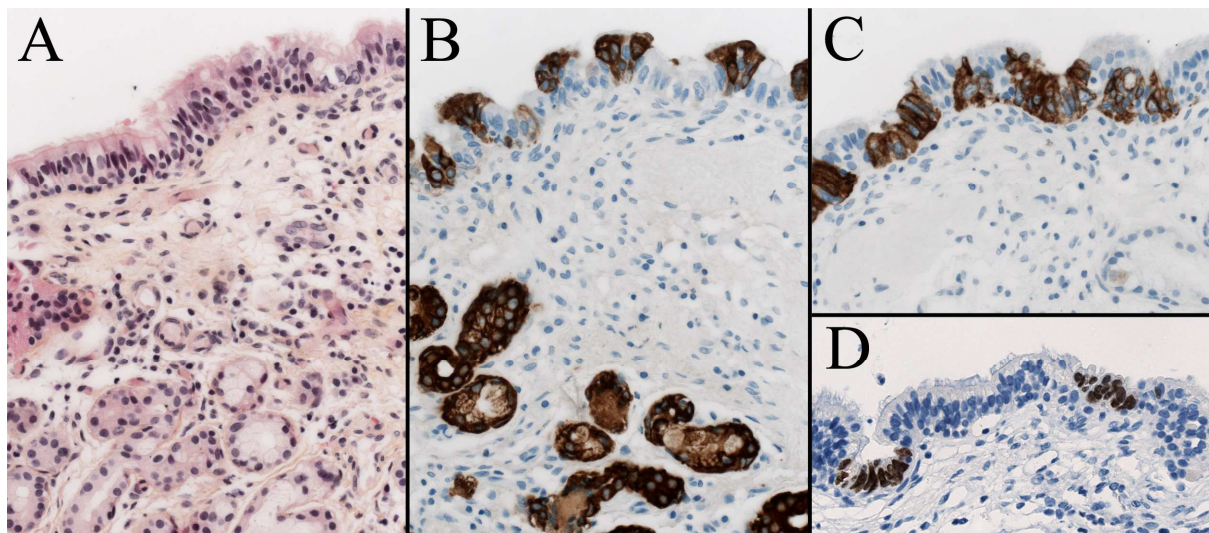


Figure 13. Exemple de lésions de métaplasie intestinale de l'épithélium respiratoire chez un patient atteint d'un ITAC. Ces lésions correspondent à une transformation de l'épithélium respiratoire en un épithélium de type intestinal avec notamment augmentation du nombre des cellules caliciformes (A ; HES x400) et acquisition d'un immunophénotype de type intestinal [CK7- (B), CK20+ (C) et CDX-2+ (D)], (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

Ces faits impliquent des mesures de protection professionnelle chez les travailleurs du bois. La priorité est à la prévention primaire. Elle comprend l'information des salariés, des mesures de protection individuelle et collective visant à diminuer l'exposition aux poussières de bois, le repérage et la traçabilité des expositions, et le suivi médical annuel des salariés.

Un protocole de dépistage ciblé par nasofibroscopie est proposé tous les deux ans chez tout travailleur du bois exposé pendant plus de douze mois cumulés ou au-delà de trente ans après le début de l'exposition⁶. Un suivi médical et un protocole de dépistage ciblé par nasofibroscopie sont aussi recommandés, avec les mêmes modalités, tous les deux ans dans le cadre du suivi post-professionnel. Il n'est pas recommandé dans le cadre d'un dépistage de réaliser une imagerie naso-sinusienne par radiographie, scanner ou IRM⁶.

En France, les cancers primitifs naso-sinusiens (sans distinction histologique) sont inscrits dans la liste des maladies professionnelles indemnifiables dans les tableaux n° 47 et n° 36, respectivement du régime général et agricole des maladies professionnelles indemnifiables concernant les affections professionnelles provoquées par les poussières de bois. Les critères de reconnaissance de la maladie associent une durée minimum d'exposition de cinq ans à un délai de prise en charge de 40 ans (durée maximale entre la fin d'exposition et le diagnostic) dans le cadre de travaux exposant à l'inhalation des poussières de bois tels que travaux d'usinage des bois (sciage, fraisage, rabotage, perçage et ponçage) ou travaux effectués dans les locaux où sont usinés les bois.

Le travail du cuir est lui aussi un facteur de risque^{21,25} avec, selon l'intensité de l'exposition, un risque relatif de 3 à 26 de présenter un adénocarcinome naso-sinusien. L'exposition aux poussières de textile a elle aussi été incriminée²¹. Contrairement aux carcinomes épidermoïdes naso-sinusiens le rôle du tabac est très secondaire²¹.

2.3. Mécanismes de l'oncogenèse et perspectives thérapeutiques des ITACs : face-à-face avec les CCRs

Caractéristiques moléculaires

En raison des similitudes histologiques et immunophénotypiques qui existent entre les ITACs et les CCRs, il est rationnel de se poser la question de savoir s'il en est de même en ce qui concerne les mécanismes moléculaires de la carcinogenèse.

La carcinogénèse colorectale est la conséquence de deux mécanismes distincts : une instabilité chromosomique (cancer LOH pour *loss of heterozygosity*) dans 80 % des cas et une instabilité des microsatellites (MSI) dans les 20 % des cas restants⁵⁴.

Le premier groupe est caractérisé par une aneuploïdie et par des pertes alléliques. Fréquemment, s'y associent des mutations des gènes *APC* (*adenomatous polyposis coli*) et *TP53* (*tumor protein 53*) conduisant à leur inactivation bi-allélique.

L'autre groupe est caractérisé par une instabilité des microsatellites du fait d'une altération du système de réparation des mésappariements des bases de l'ADN (système MMR pour *mismatch repair*). Ces cancers sont le plus souvent diploïdes avec peu de pertes alléliques⁵⁵.

Dans ces deux groupes de CCRs, l'activation de la voie de signalisation de l'EGFR joue un rôle important dans la tumorigenèse et la progression tumorale⁷.

L'*EGFR* situé en 7p12, code pour 4 transcrits ou variants (v1 à 4) obtenus après épissage alternatif et dont la traduction génère respectivement le récepteur complet transmembranaire (isoforme a) et les isoformes b, c et d.

L'isoforme a correspond au récepteur tyrosine kinase EGFR ou *human epidermal receptor 1* (HER1), chef de file de la famille HER. Il comporte trois domaines : extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire.

Lors de la fixation d'un de ses ligands [comme l'*epidermal growth factor* (EGF), le *transforming growth factor α* (TGF α), la β -celluline, l'amphiréguline ou l'épiréguline] l'EGFR se dimérise (homodimère ou hétérodimère avec HER2, 3 ou 4)⁵⁶ permettant la phosphorylation du domaine tyrosine kinase intracellulaire et l'activation des voies de transduction en aval tels que : *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS) – *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B* (BRAF) – *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) et phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) – *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1* (AKT).

Ces deux voies régulent la transcription de gènes qui interviennent dans des mécanismes fondamentaux de l'oncogénèse tels que la prolifération, la survie cellulaire, le caractère invasif et métastatique des cellules tumorales et la néoangiogénèse (**Figure 14**).

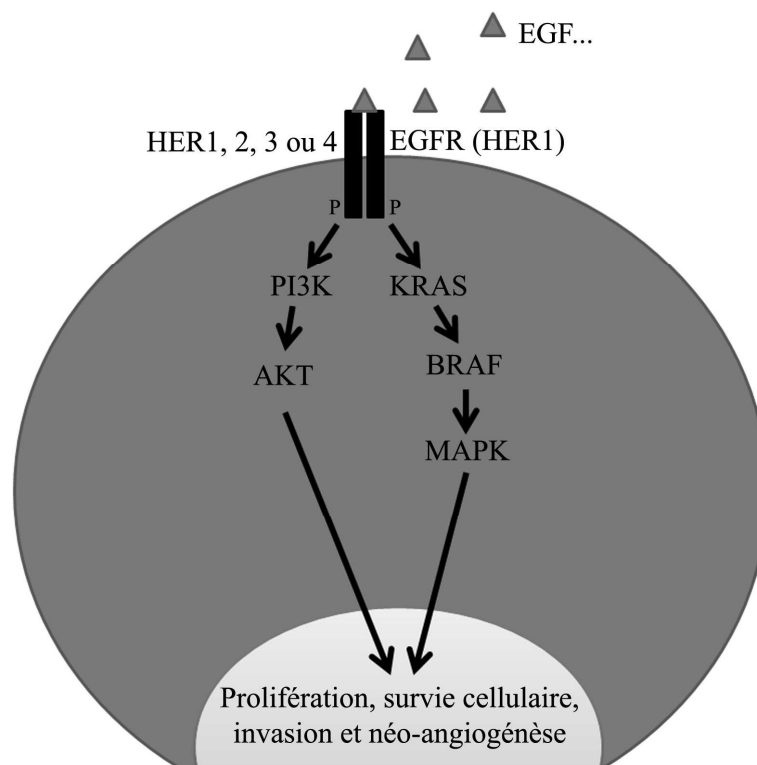


Figure 14. Voies de signalisation de l'EGFR, adapté de Ciardiello et al⁵⁶.

Les isoformes b, c et d correspondent à des récepteurs EGFR tronqués⁵⁷. Ils ont un domaine extracellulaire complet ou tronqué et sont dépourvus de domaine intracellulaire. Ils auraient un rôle dans la régulation de l'EGFR, notamment par hétérodimérisation^{58,59}.

Dans les CCRs, différentes altérations de l'EGFR ont été décrites : une surexpression protéique de l'EGFR (14 à 34 % des cas ; expression dans 60 à 80 % des cas)⁶⁰⁻⁶², une surexpression génique de l'EGFR (79 % des cas)⁶¹, et une augmentation du nombre de copies de l'*EGFR* par amplification génique de l'*EGFR* (0 à 51 % des cas) ou par polysomie du chromosome 7 (au moins 30 % des cas)^{63,64}.

Dans quelques séries d'ITACs, il a été mis en évidence : une surexpression protéique de l'EGFR (15 à 30 % des cas ; expression dans 21 à 63%)^{44,65,66}, une amplification génique de l'*EGFR* (8 à 14 % des cas) et une polysomie du chromosome 7 (33 à 46 % des cas)^{44,65}.

Les variants 2 à 4 de l'EGFR, codant respectivement les isoformes tronquées (b, c, d), ont été décrits dans certaines tumeurs^{57,67,68} telles que les gliomes infiltrants, les méningiomes et les adénocarcinomes bronchiques. Ils n'ont pas été étudiés dans les CCRs et les ITACs.

La variabilité des résultats rapportés dans la littérature concernant l'expression protéique de l'EGFR et l'amplification génique de l'*EGFR* peut être expliquée par l'absence de critères consensuels d'interprétation des analyses par IHC et par hybridation *in situ* (HIS)^{63,69}, la distribution hétérogène de la surexpression protéique de l'EGFR et de l'amplification de l'*EGFR* notamment dans les CCRs^{60,70-72}, l'utilisation d'anticorps différents selon les équipes⁷³, et la présence de plusieurs isoformes de l'EGFR avec leurs spécificités antigéniques propres.

Des mutations du gène de l'*EGFR* peuvent intéresser la partie codante du domaine extracellulaire. Dans cette région la plupart des anomalies aboutissent à la formation d'un transcrit mutant EGFRvIII (délétion 274-1076), traduit en une protéine transmembranaire tronquée constitutivement active. Ce transcrit a été décrit dans certaines tumeurs⁷⁴ telles que les glioblastomes, les carcinomes mammaires et ovariens. Ce mutant vIII n'a pas été observé dans les CCRs⁷⁵ et n'a pas été étudié dans les ITACs.

Des mutations du gène de l'*EGFR* peuvent intéresser la partie codante du domaine kinase intracellulaire (notamment les exons 18 à 21). Elles sont fréquentes dans les adénocarcinomes bronchiques⁷⁶. Il peut s'agir de substitution (L858R sur l'exon 21 dans 41 % des cas, G719X sur l'exon 18 dans 4 % des cas), de délétion (exon 19 dans 44 % des cas) ou d'insertion (exon 20 dans 5 % des cas) aboutissant à une activation du domaine tyrosine kinase et des voies de signalisation en aval⁷⁷. Contrairement aux adénocarcinomes bronchiques, ces mutations sont rares dans les CCRs⁷⁸ et dans les ITACs⁴⁴.

Le gène *KRAS* situé en 12p12.1 code pour une petite protéine G participant à la transduction du signal engendrée par l'*EGFR*. Active quand elle est couplée au guanosine triphosphate (GTP) et inactive quand elle est liée au guanosine diphosphate (GDP), elle est régulée par d'autres protéines telles que les *G exchange factor* (GEF) et *GTPase activating protein* (GAP). Le gène *BRAF* situé en 7q34 code pour une kinase sérine / thréonine impliquée aussi dans la cascade de transduction de l'*EGFR* en aval de *KRAS*.

Dans les CCRs, 20 à 50 % des cas présentent une mutation de *KRAS* qui est dans plus de 90 % des cas une substitution au niveau des codons 12 ou 13 de l'exon 2^{7,79}. Selon les études, 0 à 12 % des CCRs ont une mutation de *BRAF* qui dans plus de 90 % des cas correspond à une substitution au niveau du codon 600 de l'exon 15^{7,79}. Ces mutations sont généralement exclusives l'une de l'autre et indépendantes d'une augmentation du nombre de copies de l'*EGFR*^{7,80}.

Dans les ITACs, la fréquence des mutations de *KRAS* est de 13 à 50 % tandis que celles de *BRAF* sont absentes ou rares (4 %)^{44,45,66,81}. Les mutations de *KRAS* correspondent le plus souvent à une substitution G > A, qui dans des systèmes expérimentaux, pourrait être en relation avec l'exposition aux poussières de bois⁸¹.

PI3K peut être activée par deux principaux mécanismes : par les récepteurs tyrosine kinase phosphorylés comme l'*EGFR* après son recrutement au niveau de la membrane plasmique et par interaction directe avec RAS. L'expression de PI3K est régulée négativement par la *phosphatase homologue to tensin* (PTEN).

Dans les CCRs, des mutations de PI3K dans 11 % des cas et une perte de PTEN dans 30 à 40 % des cas ont été rapportées^{7,82}. Ces anomalies n'ont pas été étudiées dans les ITACs.

Les altérations du gène suppresseur de tumeur *TP53*, situé en 17p13.1, sont fréquemment impliquées dans les processus de carcinogenèse et notamment dans les CCRs et les ITACs. Des mutations de *TP53*, dans la majorité des cas par substitution, sont retrouvées dans 35 à 45 % des CCRs⁸³ et dans 18 à 88 % des ITACs⁸⁴.

L'accumulation protéique de p53 détectable en immunohistochimie dans 20 à 80 % des ITACs semble être un bon indicateur de mutation de *TP53*⁸⁵⁻⁸⁷. Une perte de fonction de p53 peut aussi s'observer sans accumulation protéique, en cas de mutation non-sens (rares dans les ITACs) ou par altération de certains de ces régulateurs tels que *p14^{ARF} - murine double minute-2 (MDM2)*^{20,85}.

Les anomalies de p53 semblent être un événement précoce dans l'oncogenèse des ITACs, décelées dans les muqueuses sinusiennes métaplasiques de travailleurs exposés au bois⁸⁷.

Certains mécanismes de l'oncogenèse des CCRs et des ITACs s'opposent. Ainsi, alors qu'aucune mutation inactivatrice d'*APC* n'a été rapportée dans les ITACs^{88,89}, elles sont observées dans 34 à 72 % des CCRs⁹⁰. De plus, 10 à 15 % des CCRs sporadiques et 50 à 70 % des cancers survenant dans le cadre d'un syndrome *hereditary non polyposis colorectal cancer (HNPCC)* ont une instabilité des microsatellites⁹¹, due à une altération des gènes du système MMR par hyperméthylation du promoteur ou par mutation. Le système MMR ne semble pas être impliqué dans l'oncogenèse des ITACs⁹².

Perspectives thérapeutiques

Les patients atteints de CCRs au stade métastatique peuvent bénéficier de thérapies ciblées anti-EGFR (anticorps monoclonaux Cetuximab et Panitumumab), le plus souvent associées à une chimiothérapie conventionnelle^{8,93}. Ces molécules, inactivant le domaine extracellulaire de l'EGFR et conduisant à une inhibition des voies de transduction en aval, ont montré leur efficacité en terme d'amélioration de la survie globale et de la survie sans progression.

L'efficacité de ces thérapeutiques est cependant sous la dépendance d'altérations d'autres acteurs moléculaires tels que : des mutations de *KRAS* (principal marqueur de résistance⁹⁴ : un statut *KRAS* sauvage est requis lors de la prescription du Cetuximab ou du Panitumumab⁸), de *BRAF*⁹⁵, de *NRAS* (*neuroblastoma-RAS*)⁹⁶, de *PI3K*⁹⁶ ; une perte d'expression protéique de PTEN⁶³ ; l'amplification de *MET*⁹⁷ et d'*ERBB2* (*v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*)^{98,99}. La plupart de ces marqueurs ont aussi une valeur pronostique dans les CCRs⁶³.

Le gène *MET* situé en 7q21 code pour le récepteur MET ou *hepatocyte growth factor receptor* (HGFR) constitué de deux sous-unités, une chaîne α extracellulaire et une chaîne β transmembranaire à domaine tyrosine kinase intracellulaire¹⁰⁰. La fixation de son ligand l'*hepatocyte growth factor* (HGF), notamment sécrété par les fibroblastes, induit une homodimérisation et une activation du domaine tyrosine kinase. Les voies de signalisations activées en aval sont les mêmes que celles activées par l'EGFR, telles que KRAS – BRAF – MAPK et PI3K – AKT¹⁰¹. Des interactions et une synergie ont été décrites entre les récepteurs MET et EGFR^{100,102-105}.

Des anomalies de MET ont été rapportées dans les CCRs comme des surexpressions protéiques et géniques¹⁰⁶ ainsi que de rares amplifications¹⁰⁷. Ces altérations n'ont pas été étudiées dans les ITACs.

Le gène *ERBB2* situé en 17q12, code pour le récepteur tyrosine kinase HER2. L'expression membranaire d'HER2 est analysée en routine dans les adénocarcinomes mammaires et gastriques par IHC et par HIS dans les cas intermédiaires en IHC.

Dans les CCRs, la surexpression protéique membranaire d'HER2 est retrouvée dans 0 à 15 % des cas¹⁰⁸ et l'amplification génique d'*ERBB2* dans 2 % des cas¹⁰⁹.

Dans les ITACs, la surexpression protéique membranaire d'HER2 et l'amplification génique d'*ERBB2* semblent rares¹¹⁰⁻¹¹².

3. Objectifs et déroulement du travail

En raison des similitudes morphologiques et immunophénotypiques qui existent entre les ITACs et les CCRs, l'hypothèse que ces deux types tumoraux pourraient partager des mêmes mécanismes d'oncogenèse a été avancée. Dans les CCRs, ainsi que dans d'autres types tumoraux, l'EGFR est un marqueur moléculaire pronostique et théranostique. Sa fonction est sous la dépendance des kinases impliquées dans la transduction intracellulaire du signal telles que KRAS et BRAF⁵⁶. Il semble être en interaction avec d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase comme MET et HER2^{56,100,102-105,113}.

L'objectif de notre travail a été d'évaluer l'implication éventuelle de la voie de signalisation de l'EGFR dans les ITACs et d'identifier de potentiels marqueurs pronostiques moléculaires, afin de mieux comprendre les mécanismes de l'oncogenèse de ces tumeurs et d'identifier d'éventuelles nouvelles cibles thérapeutiques.

Nous avons dans un premier temps dans une série de 39 ITACs, étudié les expressions protéique et génique de l'EGFR, quantifié le nombre de copies du gène et analysé son statut mutationnel. Le statut mutationnel de *KRAS* et *BRAF* a été parallèlement évalué. Cette étude, publiée dans l'article « *Epidermal growth factor receptor expression and KRAS and BRAF mutations: study of 39 sinonasal intestinal-type adenocarcinomas* »¹¹⁴ (**Annexe 1**) a montré une certaine homologie des altérations de l'EGFR entre les ITACs et les CCRs, notamment concernant l'expression de l'EGFR et son amplification génique. Cependant, la taille de notre série ne nous a pas permis d'évaluer précisément la valeur pronostique de l'amplification de l'*EGFR* (qui semble être un événement assez rare dans ce type de tumeur), ainsi que son association avec la surexpression protéique.

En conséquence, nous avons dans un second temps étudié dans une série complémentaire de 72 cas, l'expression protéique et le nombre de copies de l'*EGFR*. Dans cette même série, nous avons également analysé l'expression protéique de MET et d'HER2 ainsi que le nombre de copies de *MET*.

4. Etude de l'EGFR et des mutations de KRAS et BRAF dans une série de 39 ITACs

4.1. Objectif

Notre objectif principal était d'évaluer l'implication éventuelle de la voie de signalisation de l'EGFR dans l'oncogénèse des ITACs et d'identifier de potentiels marqueurs pronostiques moléculaires.

Dans ce but nous avons analysé dans une série de 39 ITACs : l'expression protéique de l'EGFR par IHC à l'aide d'anticorps reconnaissant le domaine extracellulaire de l'EGFR (EGFR_{DEC}) et le domaine intracellulaire de l'EGFR (EGFR_{DIC}) ; le nombre de copies de l'EGFR par *fluorescence in situ hybridization* (FISH) ; le statut mutationnel de l'EGFR, de KRAS et de BRAF par *polymerase chain reaction* (PCR) et séquençage ; l'expression génique de l'EGFR (v1 à 4 et vIII mutant) par *quantitative reverse transcription* PCR (RT-qPCR). Les résultats ont été analysés en fonction des données cliniques et histologiques, et de survies (globale et sans progression).

4.2. Matériels et méthodes

4.2.1. Patients et prélèvements tissulaires

Les prélèvements tissulaires ont été obtenus à partir de 39 patients opérés au CHU de Limoges pour un ITAC, entre 1996 et 2011. Les patients présentant un antécédent de CCR ont été exclus.

Lors de la réception des prélèvements au laboratoire d'anatomie pathologique, un fragment tumoral a été cryopréserver par immersion dans de l'azote liquide et conservé à -140°C. Le reste du prélèvement a été fixé dans du formol à 10 % dans 35 cas ou dans du liquide de Bouin (solution d'acide picrique, de formol et d'acide acétique) dans quatre cas, pendant une durée de 12 à 24 h. Ces prélèvements ont été par la suite déshydratés, imprégnés et inclus en paraffine.

Des coupes de 4 à 5 µm ont été réalisées puis colorées à l'HES, et avec les colorations par le PAS et le bleu alcian. La densité tumorale a été évaluée pour chaque cas sur coloration standard (HES). Le type histologique a été défini selon la classification de l'OMS et le sous-type histologique selon celle de Barnes³. Les données cliniques et de survies ont été obtenues rétrospectivement. Le recueil des échantillons a été effectué conformément aux dispositions de la loi de Bioéthique de 2004.

4.2.2. Analyse de l'expression protéique de l'EGFR par IHC

Des coupes de 4 à 5 µm d'épaisseur d'un échantillon tissulaire tumoral et non tumoral inclus en paraffine ont été incubées avec trois anticorps anti-EGFR : anti-EGFR_{DEC} reconnaissant le domaine extracellulaire du récepteur ; anti-EGFR_{DIC} reconnaissant le domaine intracellulaire du récepteur ; anti-EGFR_{p1068} reconnaissant la forme phosphorylée du récepteur au niveau de la tyrosine en position 1068 (**Tableau 3**).

La méthode consiste en un simple marquage par technique peroxydase anti-peroxydase indirecte en trois temps, d'une manière automatisée (BenchMark XT ICH/ISH, Ventana, Illkirsh, France) selon les recommandations du fournisseur : déparaffinage, lavage au sodium chloride sodium citrate (SSC), prétraitement thermique (*Cell conditioning 1*) ou enzymatique (Protéase 1), inhibition des peroxydases endogènes (iView Inhibitor, Ventana), blocage des biotines endogènes si besoin (A/B block, Ventana), fixation spécifique des anticorps primaires puis des anticorps secondaires biotinylés (iView Biotinylated Ig, Ventana) puis du complexe streptavidine-peroxydase (iView Avidin HRPO, Ventana), révélation avec le chromogène diaminobenzidine (iView DAB Chromogen, iView H₂O₂, Ventana), contre-coloration à l'hématoxyline, lavage et montage des lames en milieu non aqueux.

Tableau 3. Caractéristiques des anticorps anti-EGFR utilisés en immunohistochimie.

Anticorps	Domaine cible	Isoformes cibles	Dilution	Fournisseur
EGFR_{DEC} Clone 3C6	Extracellulaire	a, b, c, d, vIII	Pur	Ventana, Illkirsh, France
EGFR_{DIC} Clone EGFR.25	Intracellulaire	a, vIII	1/50	Novocastra, Nanterre, France
EGFR_{p1068} Polyclonal	P-Tyr1068	a, b, c, d, vIII	1/500	Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France

Des contrôles négatifs isotypiques ont été réalisés pour chaque anticorps. La validité de la technique pour les anticorps anti-EGFR_{DEC} et anti-EGFR_{DIC} reposait sur le marquage de l'assise basale de l'épithélium respiratoire¹¹⁵.

Le marquage anti-EGFR (EGFR_{DEC}, EGFR_{DIC}, EGFR_{p1068}) a été interprété, selon la littérature^{60,65}, comme : négatif (0) ; marquage faible (1+) membranaire, cytoplasmique ou les deux ; marquage modéré (2+) membranaire, fréquemment associé à un marquage cytoplasmique de plus faible intensité ; marquage fort (3+) membranaire, habituellement associé à un marquage cytoplasmique de plus faible intensité. Une forte intensité de marquage (3+) a été considérée comme une surexpression. Pour les analyses statistiques, les tumeurs ont été classées selon leur plus forte intensité de marquage. Tous les cas ont été analysés avec les anticorps anti-EGFR_{DEC} et anti-EGFR_{DIC}. Seuls les cas positifs avec les anticorps anti-EGFR_{DEC} et/ou anti-EGFR_{DIC} ont été analysés avec l'anti-EGFR_{p1068}.

4.2.3. Analyse du nombre de copies de l'EGFR par FISH

La FISH consiste en une hybridation *in situ* de l'acide désoxyribonucléique (ADN) cible, grâce à des sondes d'ADN marquées par des fluorochromes. Elle a été réalisée sur coupes en paraffine de 3 à 4 µm d'épaisseur (adjacentes aux coupes réalisées pour l'IHC), sur lame de verre dégraissée, avec la sonde ZytoLight SPEC EGFR/centromère 7 (CEN 7) *Dual Color Probe* (Zytovision, Clinisciences, Nanterre, France).

Les étapes de la technique, selon les recommandations du fournisseur (Zytovision), ont été : déparaffinage (incubation à 56°C pendant 16 h, xylène pendant 20 min, éthanol absolu puis à 90°C puis à 70°C pendant 5 min), protéolyse [*Heat Pretreatment Solution Citric* (Zytovision) pendant 15 min à 95°C et traitement par la pepsine en chambre humide pendant 10 min à 37°C], lavage (*Wash buffer*, Zytovision) et déshydratation à l'éthanol, dénaturation de l'ADN pendant 10 min à 70°C et hybridation avec 10 µl de sonde pendant 16 h à 37°C en chambre humide (HYbrit, Vysis), lavage (*Wash buffer*, Zytovision) et déshydratation à l'éthanol, contre-coloration nucléaire avec 10 µl d'agent intercalant 4',6' di amidino-2-phényl indole (DAPI). La sonde a été appliquée sur les zones tumorales présentant le plus fort marquage anti-EGFR.

La lecture a été réalisée à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Axioplan 2 Imaging, Carl Zeiss, Marly le Roi, France) avec filtres adaptés (DAPI, Zygreen, ZyOrange). Les images ont été acquises avec une caméra haute résolution (Coolsnap, Photometrics) et traitées par le logiciel Cytovision (Applied Imaging). Pour chaque lame, au moins 100 noyaux interphasiques non superposés ont été analysés sur au moins cinq champs à fort grossissement. L'*EGFR* est révélé par un signal vert et le centromère du chromosome 7 par un signal rouge.

Trois catégories ont été définies : (1) amplification de l'*EGFR* [au moins un des critères suivants : ratio moyen de l'ensemble des noyaux analysés $EGFR / CEN\ 7 \geq 2$, amas d'*EGFR* (au moins quatre copies d'*EGFR* rapprochées) dans au moins 10 % des noyaux analysés, au moins quinze copies d'*EGFR* dans au moins 10 % des noyaux analysés]¹¹⁶ ; (2) polysomie du chromosome 7 (au moins 3 copies de CEN 7 dans plus de 30 % des noyaux analysés)^{44,65} ; (3) absence d'augmentation du nombre de copies d'*EGFR* (absence d'amplification de l'*EGFR* et de polysomie du chromosome 7).

4.2.4. Extraction de l'ADN génomique

Après contrôle de densité tumorale, 10 mg de tissu tumoral inclus en paraffine ont été prélevés. Le tissu a été déparaffiné par incubation avec du xylène pendant 10 min puis avec de l'éthanol absolu pendant 30 sec. L'extraction d'ADN génomique (ADNg) a été ensuite réalisée selon les recommandations du fournisseur (QIAamp DNA microkit, Qiagen, Courtaboeuf, France). Les différentes étapes ont été : lyse [tampon ATL et protéinase K (Qiagen) pendant une nuit à 56°C et 1 h à 90°C], filtration du lysat sur colonne de silice [tampon AL (Qiagen), éthanol], lavage de l'ADN fixé sur la silice [tampons AW1 et AW2 (Qiagen)] et élution de l'ADN [20 µl de tampon AE (Qiagen)]. Une étape de digestion par la RNase A (Qiagen) pendant 15 min a permis de prévenir une éventuelle contamination par des ARN.

La concentration des ADNg obtenus pour chacun des prélèvements a été évaluée par spectrophotométrie (NanoDrop 1000 ; Labtech, Palaiseau, France). Le rapport d'absorbance A260 / A280 reflète la pureté de l'extraction. L'ADNg a été dilué pour une concentration finale de 10 ng/µl puis stocké à -20°C.

4.2.5. Analyse des mutations de l'EGFR, de KRAS et BRAF

Le statut mutationnel des exons 18 (p.G719X), 19 (délétion), 20 (insertion codon S768 et p.T790M) et 21 (p.L858R et p.L861Q) a été évalué par pyroséquençage.

Pour chaque tumeur les quatre régions ont été amplifiées séparément par PCR avec le kit Therascreen EGFR Pyro (Qiagen), selon les recommandations du fournisseur, en présence de 1 µL d'amorces biotinylées (Séq EGFR 719 ou Ex 19 Del ou 768+790 ou 858-861 ; Qiagen), de 10 ng d'ADNg et du Master Mix PCR PyroMark (Qiagen) contenant la HotStartTaq ADN polymérase, dans un volume réactionnel de 20 µL. Les différentes étapes ont été : activation enzymatique à 95°C (15 min), 42 cycles d'amplification comportant chacun une étape de dénaturation de 20 sec à 95°C, d'hybridation de 30 sec à 53°C et d'élongation de 20 sec à 72°C.

Les amplicons biotinylés, après immobilisation sur billes de sépharose – streptavidine haute performance (Qiagen), ont été capturés par des sondes à filtres sous vide permettant de faciliter les étapes de purification, dénaturation, lavage et hybridation des amorces de séquences correspondantes aux régions amplifiées (Séq EGFR 719 ou 19 del ou 768 ou 790 ou 858-861 ; Qiagen).

Le pyroséquençage a été réalisé sur un PyroMark Q24 System (Qiagen) en présence du produit de PCR préparé, d'un mélange d'enzymes [ADN polymérase, adénosine triphosphate (ATP) sulfurylase, luciférase et apyrase] et de substrats [adénosine phosphosulfate, luciférol, désoxyribonucléotides (dNTP) comprenant des dATPαS]. Les dNTP sont introduits dans le mélange de manière séquentielle. Lors de l'incorporation d'un nucléotide dans le brin en extension, un pyrophosphate est libéré, ce qui induit l'émission d'un signal lumineux. Ce signal, mesurable par un capteur *Charge Coupled Device* (CCD), est proportionnel au nombre de nucléotides incorporés.

Le pyrogramme obtenu pour chaque échantillon a été analysé avec le logiciel PyroMark Q24 (Qiagen). Les différents échantillons ont été amplifiés et séquencés en parallèle avec un témoin négatif (eau pure), un témoin sauvage et muté (provenant d'adénocarcinomes pulmonaires inclus en paraffine après fixation formolée).

Le statut mutationnel de l'exon 2 de *KRAS* et de l'exon 15 de *BRAF* a été évalué par *high-resolution melting* (HRM). Il s'agit d'une méthode d'analyse post-PCR utilisée pour l'identification de variations génétiques dans les séquences d'acide nucléique. Elle est basée sur le principe de fusion de l'ADN pour lequel une température de fusion (T_m) est fonction, entre autres, de sa composition en bases nucléotidiques. La région d'intérêt est amplifiée par PCR quantitative en temps réel, en présence d'un agent intercalant qui a la propriété d'émettre une fluorescence seulement lorsqu'il est intercalé dans l'ADN double brin. Après atteinte de la phase plateau de la PCR, l'ADN est très lentement chauffé par une augmentation progressive de la température ($0,1^\circ\text{C} / \text{sec}$). Cette deuxième étape permet d'identifier, sur la courbe de fusion, la T_m d'un échantillon, ou température à laquelle 50 % des amplicons se dénaturent et cessent d'émettre une fluorescence. Pour une même région amplifiée, l'existence d'une mutation fait varier la T_m , ce qui est indiqué par un décalage entre les courbes de fusion de l'allèle sauvage et de l'allèle muté.

La PCR quantitative en temps réel a été réalisée sur un thermocycleur 7500 FAST (Life Technologies, Saint-Aubin, France) avec le kit Melt Doctor HRM Master Mix (Life Technologies), selon les recommandations du fournisseur, en présence de $0,2 \mu\text{M}$ d'amorces (**Tableau 4**) et de 20 ng d'ADNg dans un volume réactionnel de $20 \mu\text{L}$. Le kit Melt Doctor HRM Master Mix (Life Technologies) comprend l'ADN polymérase, du MgCl_2 , des dNTP, du tampon 1X et le fluorochrome intercalant Syto 9. Les différentes étapes ont été : activation enzymatique à 95°C (15 min) puis 40 (*KRAS*) ou 50 (*BRAF*) cycles d'amplification comportant chacun une étape de dénaturation de 15 sec à 96°C , une étape d'hybridation de 20 sec à 56°C (*KRAS*) ou 60°C (*BRAF*) et une étape d'élongation de 20 sec à 72°C . Les différents échantillons ont été amplifiés en double, et en parallèle avec un témoin négatif (eau pure), un témoin sauvage (lignée cellulaire de CCR, HT29:HTB-38 ; LGC Standards, Molsheim, France) et un témoin muté (lignée cellulaire de CCR, SW620:CCL-227 ; LGC Standards). Les courbes de fusion ont été analysées avec le logiciel HRM v2.0.1 (Life Technologies).

Les échantillons avec un profil de fusion différent du témoin sauvage ont été séquencés, afin de déterminer si la variation était due à une mutation et de déterminer la nature de cette mutation.

Pour ces échantillons, les produits de PCR HRM ont été purifiés avec les kits NucleoSpin Gel et PCR Clean-up (Macherey Nagel, Hoerd, France) selon les recommandations du fournisseur comprenant les étapes de fixation des ADN sur une colonne de silice, de lavage (tampon NT3 ; Macherey Nagel) et d'éluion (tampon NE ; Macherey Nagel).

La réaction de séquençage consiste à déterminer la succession des nucléotides du fragment d'ADN à analyser. Elle a été réalisée avec le kit Big Dye Terminator V1.1 (Life Technologies), selon les recommandations du fournisseur, en présence de 0,2 μM d'amorce sens ou anti-sens (**Tableau 4**), de 1 μL de produit PCR purifié dans un volume final de 10 μL . Le kit Big Dye Terminator V1.1 (Life Technologies) comprend l'ADN polymérase, du MgCl_2 , du tampon, des dNTP et des didésoxyribonucléotides (ddNTP) chacun marqué par un fluorochrome différent et ayant la propriété de stopper l'élongation. La réaction de séquençage a été effectuée selon le programme suivant : activation enzymatique à 96°C (1 min) puis 35 cycles comportant chacun une étape de dénaturation de 10 sec à 96°C, une étape d'hybridation de 5 sec à 56°C et une étape d'élongation de 4 min à 60°C. Le produit de séquençage a été purifié avec le kit DyeEx 2.0 Spin (Qiagen) utilisant un gel filtrant. Après dénaturation du produit de séquençage purifié (95°C pendant 5 min) la lecture de séquence a été réalisée par électrophorèse capillaire (Genetic Analyzer 3130XL ; Life Technologies).

Cinq cas ont été exclus des analyses, quatre parce qu'ils étaient fixés au liquide de Bouin et un en raison d'une densité tumorale inférieure à 20 %.

Tableau 4. Amorces *KRAS* et *BRAF* utilisées pour la PCR et le séquençage.

Amorces	Séquence (5' vers 3')
<i>KRAS</i> exon 2 (sens)	TTATAAGGCCTGCTGAAAATG
<i>KRAS</i> exon 2 (anti-sens)	CAAGATTTACCTCTATTGTTGGATCA
<i>BRAF</i> exon 15 (sens)	TGTTTTCTTTACTTACTACACCTCAGA
<i>BRAF</i> exon 15 (anti-sens)	TGTCTGGATCCATTTTGTGG

4.2.6. Extraction de l'ARN

Après contrôle de densité tumorale sur coupe de 4 à 5 μm réalisée au cryostat puis colorée au bleu de toluidine, onze cas ont été exclus du fait d'une densité tumorale inférieure à 20 % (nécrose et/ou intense réaction inflammatoire).

Dix à 30 mg de tissu tumoral ont été broyés en deux étapes de 40 sec à la vitesse de 6500 rotations par minute (rpm) en présence de billes de céramiques CK14, de 600 μL de tampon de lyse RLT (RNeasy mini kit ; Qiagen) et de 6 μL de 2-mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) dans un broyeur Precellys 24 (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

La purification des ARN totaux a été réalisée avec le kit RNeasy mini (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur, comprenant les étapes de fixation du lysat sur colonne de silice (éthanol), de purification (tampons RW1 et RPE ; Qiagen) et d'élution (20 μL d'eau RNase-free ; Qiagen). Une étape de digestion par la DNase I - RNase-free (Qiagen) pendant 20 min a permis de prévenir une éventuelle contamination par des ADNg.

La concentration et la pureté des ARN totaux obtenus pour chacun des prélèvements ont été évaluées par spectrophotométrie (NanoDrop 1000 ; Labtech). La qualité des ARN totaux a été évaluée par électrophorèse capillaire (Bioanalyzer 2100 ; Agilent Technologies, Massy, France). Les profils générés, en particulier les électrophorégrammes des ARN ribosomiques 18S et 28S, ont été analysés avec le logiciel 2100 Expert (Agilent Technologies) pour établir un nombre d'intégrité des ARN (RIN). La qualité des ARN augmente avec le RIN.

4.2.7. Analyse de l'expression génique de l'EGFR par RT-PCR

Après une étape préalable de dénaturation de l'ARN (2 µg par échantillon) et d'hexamères de nucléotides à 65°C pendant 10 min, la transcription réverse a été réalisée dans un thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) avec le kit Transcriptor First Strand complementary DNA Synthesis (Roche, Boulogne-Billancourt, France), selon les recommandations du fournisseur, en présence de 10 mM de dNTP, de tampon de réaction (Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer ; Roche), d'inhibiteur de RNase (Protector RNase Inhibitor ; Roche) et de réverse transcriptase (Transcriptor Reverse Transcriptase ; Roche) dans un volume réactionnel de 20 µl. Les différentes étapes ont été : hybridation pendant 10 min à 25°C, élongation pendant 30 min à 55°C, dénaturation pendant 5 min à 85°C. L'ADN complémentaire (ADNc) obtenu a été dilué au cinquième puis stocké à -80°C.

Les PCR quantitative [EGFRv1-4, hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT), glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et TATA box binding protein (TBP)] et qualitative (EGFRvIII) ont été réalisées dans un thermocycleur Rotor Gene (Qiagen) avec le kit Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche) en présence de 3 mM de MgCl₂, de 0,2 µM d'amorces (EGFRv4 et vIII) ou 0,25 µM (GAPDH) ou 0,5 µM (EGFRv1-3, HPRT et TBP) (**Tableau 5**) et de 2 µL d'ADNc dans un volume réactionnel de 20 µL. Les différentes étapes ont été : activation enzymatique à 95°C (10 min) puis 40 cycles comportant chacun une étape de dénaturation de 10 sec à 95°C, une étape d'hybridation de 5 sec à 58°C (HPRT et EGFRv1, v2, v3) ou 60°C (GAPDH, TBP, EGFRv4 et vIII) et une étape d'élongation de 4 sec à 71°C.

Lors de la première utilisation, la taille des produits obtenus a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % contenant du bromure d'éthidium. Leur séquence a été vérifiée par séquençage et comparée aux bases de données¹¹⁷. Les gammes standard d'amplification des ADNc d'intérêt (EGFRv1-4 et vIII) et des ADNc de référence (HPRT, GAPDH et TBP) ont été obtenues à partir d'ADNc spécifiques qui ont été amplifiés, purifiés et dilués en série. Les échantillons ont été amplifiés en double, en parallèle avec un témoin négatif (eau pure) et avec deux dilutions standard de la gamme de référence utilisées comme calibrateurs.

La quantification relative des échantillons a été effectuée par la méthode des $\Delta\Delta Ct$ [$(CT_{\text{échantillon}} - CT_{\text{calibrateur}})_{\text{gène d'intérêt}} - (CT_{\text{échantillon}} - CT_{\text{calibrateur}})_{\text{gène de référence}}$] modifié selon Pfaffl¹¹⁸ avec correction en fonction de l'efficacité de la réaction. Les résultats ont été exprimés en unité relative arbitraire (UAR). Pour chaque gène d'intérêt (EGFRv1-4) les valeurs ont été normalisées par celles des trois gènes de référence (HPRT, GAPDH, TBP). Les niveaux d'expression de chaque variant de l'EGFR et de la somme des variants ont été qualifiés de faible et fort selon leurs valeurs médianes respectives.

Tableau 5. Amorces utilisées pour la RT-qPCR.

Amorces	Séquence (5' vers 3')
EGFRv1 exons 29-30 (sens)	CTCCCAGTGCCTGAATACATA
EGFRv1 exon 30 (anti-sens)	GGCTGATTGTGATAGACAGGA
EGFRv2 exon 15 (sens)	TGCACCTACGGGTCCTAAT
EGFRv2 exon 16 (anti-sens)	TGAAGCAAAGGGAGAAATTG
EGFRv3 exon 10 (sens)	AAGGAAATCACAGGTTTGAGC
EGFRv3 exon 10bis (anti-sens)	TCCAAGGGAACAGGAAATATG
EGFRv4 exon 15 (sens)	CTACGGGCCAGGAAATGAG
EGFRv4 exon 17 (anti-sens)	CGCTGCCATCATTACTTTGA
EGFRvIII exons 1-8 (sens)	GCTCTGGAGGAAAAGAAAGGTAAT
EGFRvIII exon 8 (anti-sens)	TCCTCCATCTCATAGCTGTGC
HPRT exon 6 (sens)	CTTTCCTTGGTCAGGCAGTA
HPRT exon 7 (anti-sens)	TGGCTTATATCCAACACTTCG
GAPDH exon 6 (sens)	AGATCCCTCCAAAATCAAGTGG
GAPDH exon 7 (anti-sens)	GGCAGAGATGATGACCCTTTT
TBP exon 6 (sens)	GAGCTGTGATGTGAAGTTTCC
TBP exon 7 (anti-sens)	TCTGGGTTTGATCATTCTGTAG

4.2.8. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec les logiciels StatView 5.0 (SAS Institute, Inc, Cary, NC) et R 2.10.1 (Department of Biometry and Evolutionary Biology, Lyon, France). Les corrélations entre les variables quantitatives ont été réalisées par le test de Spearman. Les comparaisons entre les variables qualitatives ont été réalisées par le test exact de Fisher. Les comparaisons de moyennes ont été réalisées par les tests non paramétriques de Mann-Whitney (pour deux variables) ou de Kruskal-Wallis (pour plus de deux variables). Les analyses de la survie globale et de la survie sans progression ont été effectuées par la méthode de Kaplan-Meier. Les comparaisons des courbes de survie entre les groupes ont été faites au moyen de test du Logrank. Les analyses multivariées avec choix des covariables fait par une procédure descendante ont été réalisées en utilisant le modèle de régression de Cox. Le seuil de significativité retenu a été fixé à 5 %.

4.3. Résultats

4.3.1. Caractéristiques des 39 patients

Les données cliniques et histopathologiques sont indiquées dans le **Tableau 6**. Les sous-types histologiques de la série (papillaire, colique, mucineux et mixte) sont illustrés dans la **Figure 15**.

Il n'y avait pas d'association entre les sous-types histologiques selon la classification de Barnes et les données démographiques et cliniques.

Tableau 6. Données cliniques et histopathologiques des 39 patients.

Sous-types histologiques selon Barnes		Tous	Papillaire	Colique	Mucineux	Mixte
Nombre (n) de cas		n = 39	n = 3	n = 23	n = 4	n = 9
Age médian (années)	50 à 68	20	1	14	2	3
	69 à 87	19	2	9	2	6
Sexe	Homme	37	3	22	4	8
	Femmes	2	0	1	0	1
Localisation	Ethmoïde	37	2	22	4	9
	Fosses nasales	2	1	1	0	0
Exposition aux poussières de bois	Oui	35	2	21	4	8
	Non	4	1	2	0	1
Embols tumoraux histologiques	Oui	5	0	4	0	1
	Non	34	3	19	4	8
Stade tumoral (T) selon la classification TNM 2009 de l'UICC	T1	1	0	0	1	0
	T2	18	3	11	1	3
	T3	12	0	7	1	4
	T4	8	0	5	1	2
Exérèse chirurgicale	Complète	35	3	21	3	8
	Incomplète	4	0	2	1	1
Radiothérapie complémentaire	Oui	38	3	23	4	8
	Non	1	0	0	0	1
Chimiothérapie complémentaire à base de sel de platine	Oui	8	0	5	1	2
	Non	31	3	18	3	7

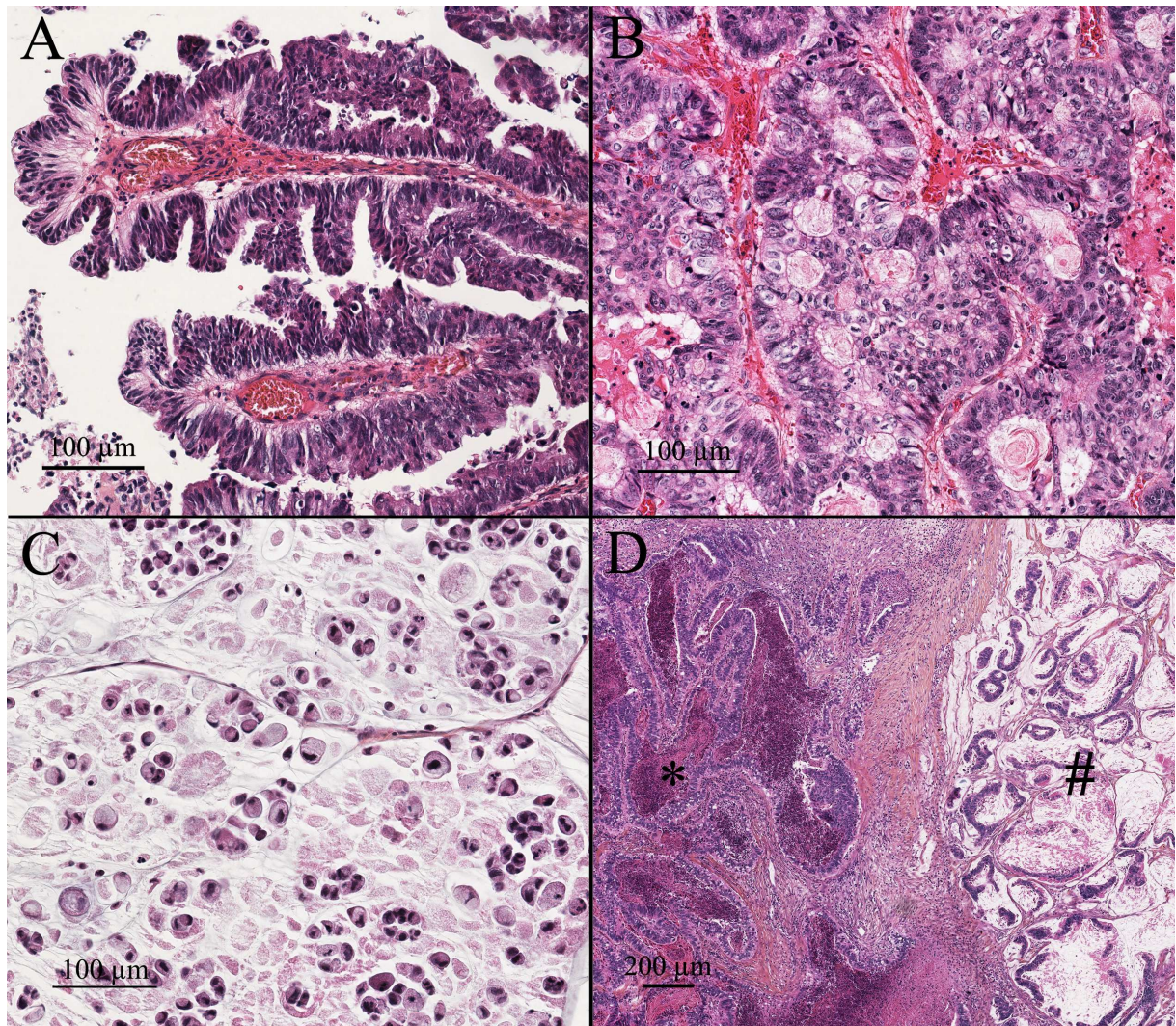


Figure 15. Sous-types histologiques de la série selon Barnes³² : papillaire (A), colique (B), mucineux à cellules en bague à chaton (C) et mixte [colique (D*) et mucineux de type alvéolaire (D#)], (HES, Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

4.3.2. Expression protéique de l'EGFR par IHC

Les résultats de l'analyse de l'EGFR en IHC avec les anticorps anti-EGFR_{DEC}, EGFR_{DIC} et EGFR_{p1068}, selon la plus forte intensité de marquage de chaque tumeur, sont donnés dans le **Tableau 7**.

Vingt-cinq cas (64,1 %) étaient positifs avec les anticorps anti-EGFR_{DEC} et/ou EGFR_{DIC}. Les sous-types histologiques correspondaient à trois ITACs papillaires, quatorze coliques, trois mucineux et cinq mixtes. Les quatorze tumeurs restantes (35,9 %) étaient négatives avec ces deux anticorps.

Les scores de marquage maximal pour chaque tumeur avec les anticorps anti-EGFR_{DEC} et EGFR_{DIC} étaient fortement corrélés entre eux ($P < 0,0001$; $\rho = 0,83$).

Au sein d'une même tumeur, le marquage anti-EGFR était d'intensité et de distribution hétérogène (**Annexe 1 : Fig. 2A**). Au moins deux intensités de marquages anti-EGFR étaient observées dans chaque tumeur. Le marquage anti-EGFR était souvent de distribution focale, parfois cerné d'un tissu tumoral dépourvu de marquage anti-EGFR.

Quatre tumeurs (10,3 %) de sous-type colique avaient un fort marquage anti-EGFR_{DEC} et EGFR_{DIC} (**Annexe 1 : Fig. 2B**). Dans tous les cas, les foyers tumoraux avec un fort marquage anti-EGFR_{DEC} se superposaient avec ceux avec un fort marquage anti-EGFR_{DIC} (**Annexe 1 : Fig. 2C et 2D**). Dans deux de ces tumeurs un marquage modéré anti-EGFR_{p1068} a été observé au sein des foyers tumoraux avec fort marquage anti-EGFR_{DEC} et EGFR_{DIC} (**Annexe 1 : Fig. 2E**). Dans les 21 tumeurs positives restantes, le marquage anti-EGFR était faible ou modéré (**Annexe 1 : Fig. 2F**), et il n'a pas été observé de marquage anti-EGFR_{p1068}.

Il n'y avait pas d'association entre le marquage anti-EGFR et les données démographiques, cliniques et histologiques.

Tableau 7. Expression protéique de l'EGFR en IHC selon la plus forte intensité de marquage de chaque tumeur de la série de 39 cas.

	EGFR _{DEC} n = 39	EGFR _{DIC} n = 39	EGFR _{p1068} n = 25*
Fort (3+)	4	4	0
Modéré (2+)	12	8	2**
Faible (1+)	9	3	0
Négatif (0)	14	24	23

(*) : l'anticorps anti-EGFR_{p1068} a été utilisé uniquement en cas de positivité des anticorps anti-EGFR_{DEC} et/ou EGFR_{DIC}
(**) : observé dans 2 cas avec un fort marquage anti-EGFR_{DEC} et EGFR_{DIC}.

4.3.3. Nombre de copies de l'EGFR par FISH

Dix-huit cas (50 %) présentaient une augmentation du nombre de copies de l'EGFR sur les 36 cas interprétables en FISH, résultant d'une amplification génique de l'EGFR et/ou d'une polysomie du chromosome 7 (**Annexe 1 : Fig. 2G et 2H**). Trois cas (8,3 %) présentaient une amplification de l'EGFR et deux d'entre eux présentaient aussi une polysomie du chromosome 7. Les quinze autres cas (41,6 %) présentaient une polysomie du chromosome 7 sans amplification de l'EGFR.

L'amplification génique était toujours de distribution focale entourée d'un tissu tumoral sans amplification, contrastant avec la distribution plus homogène de la polysomie du chromosome 7. Dans les trois cas amplifiés, les zones tumorales avec amplification de l'EGFR étaient superposables à celles qui présentaient un fort marquage anti-EGFR_{DEC} et EGFR_{DIC} en IHC (**Figure 16**). Dans deux de ces trois tumeurs, un marquage anti-EGFR_{p1068} était observé et il était limité aux zones amplifiées pour l'EGFR.

Les tumeurs avec polysomie du chromosome 7 et sans amplification de l'EGFR avaient un marquage anti-EGFR_{DEC} et/ou EGFR_{DIC} modéré, faible ou négatif, et ne présentaient pas de marquage anti-EGFR_{p1068} (**Tableau 8**).

Il n'y avait pas d'association significative entre l'amplification de l'EGFR ou la polysomie du chromosome 7 et les données démographiques, cliniques et histologiques.

Tableau 8. Relation entre les analyses de l'EGFR en FISH et en IHC de la série de 39 cas.

Analyse de l'EGFR par FISH	Analyse de l'EGFR en IHC									
	EGFR _{DEC}				EGFR _{DIC}				EGFR _{p1068} *	
	3+	2+	1+	0	3+	2+	1+	0	+	0
Amplification (n = 3)	3	0	0	0	3	0	0	0	2	1
<i>P</i>	< 0,0001				< 0,0001				= 0,0002	
Polysomie du 7 (n = 15)	0	8	4	3	0	6	2	7	0	12
<i>P</i>	= 0,06				= 0,06				= 0,14	
Pas de gain ** (n = 18)	0	4	5	9	0	2	1	15	0	9
<i>P</i>	= 0,08				= 0,04				= 0,26	
Echec (n = 3)	1	0	0	2	1	0	0	2	0	1
Tous (n = 39)	4	12	9	14	4	8	3	24	2	23

(*) : L'IHC anti-EGFR_{p1068} a été réalisée uniquement sur les tumeurs positives avec les anticorps anti-EGFR_{DEC} et/ou EGFR_{DIC}.

(**) : Absence d'amplification de l'EGFR et de polysomie du chromosome 7.

4.3.4. Mutations de l'EGFR, de KRAS et BRAF

Sur les 34 cas testés, un seul (2,9 %) avait une mutation sur la séquence codant le domaine tyrosine kinase de l'EGFR. Il s'agissait d'une délétion de quinze paires de bases de l'exon 19 (c.2235del15), correspondant à une délétion de cinq acides aminés (p.E746_A750del). Il n'a pas été observé de mutation dans les exons 18, 20 et 21 de l'EGFR.

Deux cas (5,9 %) présentaient une mutation par substitution de l'exon 13 de KRAS (**Figure 17**), de nomenclature p.G13D (c.38G > A). Il n'a pas été observé de mutation de l'exon 12 de KRAS.

Deux cas sauvages pour KRAS avaient une mutation par substitution de l'exon 2 de BRAF (**Figure 17**) correspondant pour l'un à une mutation p.V600E (c.1799T > A) et pour l'autre à une mutation p.D594G (c.1781A > G).

Les mutations de l'EGFR, de KRAS et BRAF étaient mutuellement exclusives et exclusives de l'amplification génique de l'EGFR.

Il n'y avait pas d'association significative entre les mutations de l'EGFR, de KRAS et BRAF et les données démographiques, cliniques et histologiques.

4.3.5. Expression génique de l'EGFR (v1-4 et VIII mutant)

Les transcrits EGFRv1, v3 et v4 ont été observés dans toutes les tumeurs (**Figure 18**). L'EGFRv2 a été observé seulement dans deux tumeurs. Les transcrits EGFRv1, v3 et v4 étaient fortement corrélés entre eux ($P < 0,0001$; $\rho = 0,7$ à $0,83$; **Annexe 1 : Fig. 3A, B et C**). Le transcrit EGFRvIII mutant n'a été détecté dans aucune tumeur.

Les cas avec une amplification génique de l'EGFR avaient une forte expression de la somme des transcrits EGFRv1, v3 et v4 ($P = 0,05$; **Annexe 1 : Fig. 3D**).

Il n'y avait pas d'association significative entre le niveau d'expression des transcrits de l'EGFR et les données démographiques, cliniques et histologiques.

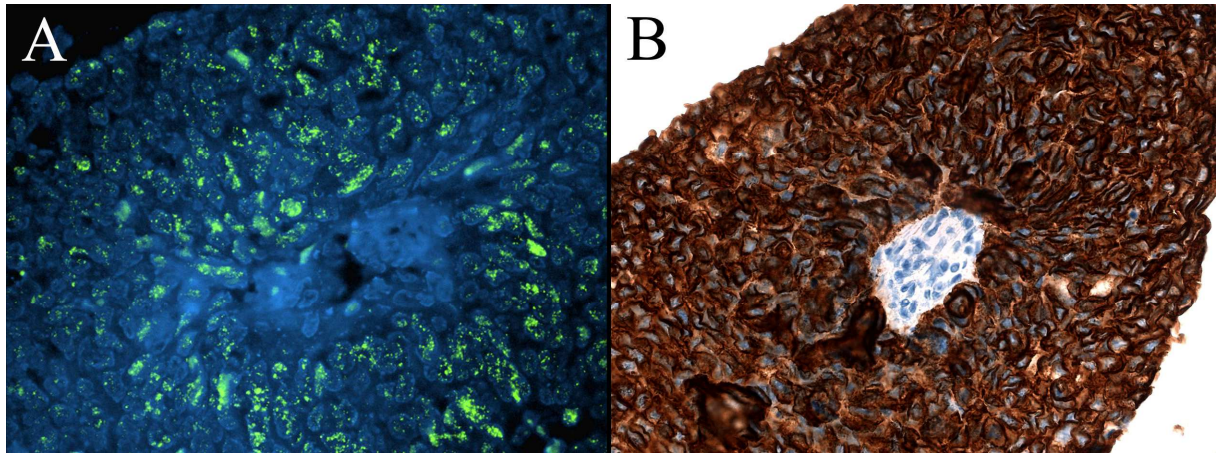


Figure 16. Superposition d'un foyer tumoral présentant une amplification génique de l'*EGFR* (**A**, FISH x400, Laboratoire de Cytogénétique, CHU de Limoges) et une surexpression protéique de l'*EGFR*_{DIC} (**B**, IHC x400, Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

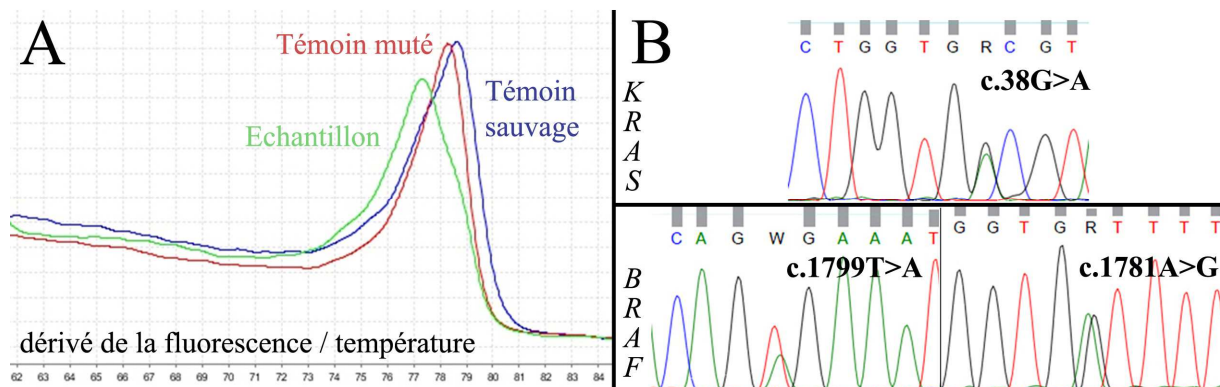


Figure 17. Exemples d'analyses par PCR HRM et séquençage [Plateforme d'oncologie moléculaire (POM), CHU de Limoges] : **A**, profil variant d'un échantillon tumoral sur la courbe de fusion analysée après PCR HRM ; **B**, présentation des mutations de *KRAS* et de *BRAF* de la série, interprétées après séquençage.

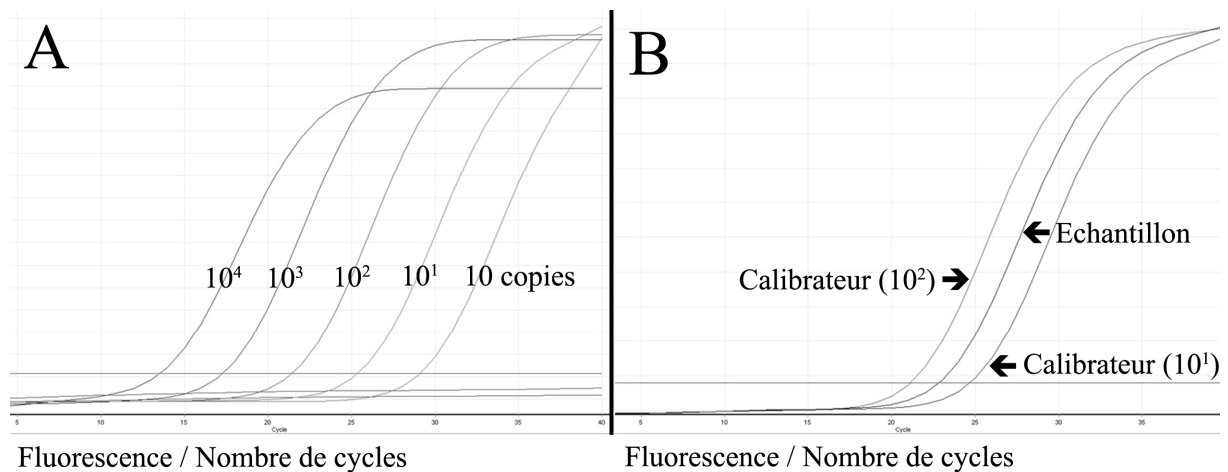


Figure 18. Exemples d'analyses par RT-qPCR (POM, CHU Limoges) : **A**, gamme de référence de GAPDH ; **B**, courbe quantitative de l'EGFRv1 d'un ITAC.

4.3.6. Relation avec la survie globale et sans progression

Au moment de l'analyse, la médiane de la survie globale était de 92,5 mois avec quatorze décès (35,9 %), et la médiane de la survie sans progression était de 140,1 mois avec douze progressions (30,8 %).

La survie globale était plus faible dans les cas suivants : exérèse tumorale incomplète ($P = 0,002$), présence à l'examen histologique d'embols tumoraux ($P = 0,02$) et forte expression du transcrit EGFRv1 ($P = 0,03$).

La survie globale et la survie sans progression n'étaient pas associées aux données démographiques, au stade tumoral, au sous-type histologique selon Barnes, à la surexpression protéique de l'EGFR, à l'expression protéique de l'EGFR phosphorylé, à l'amplification génique de l'EGFR, à la polysomie du chromosome 7, à la présence ou l'absence de mutation de l'EGFR, KRAS ou BRAF.

Une analyse multivariée par le modèle de régression de Cox a montré que la survie globale était plus faible uniquement dans le cas d'une exérèse tumorale incomplète ($P = 0,003$).

4.4. Discussion

Les ITACs partagent avec les CCRs des similitudes morphologiques et immunophénotypiques. Dans une série de 39 ITACs, nous avons étudié l'EGFR et le statut mutationnel de *KRAS* et *BRAF*.

Les analyses de l'EGFR en IHC et en FISH ont révélé une hétérogénéité tumorale. L'étude en IHC a montré une expression de l'EGFR dans environ les deux-tiers des ITACs et une surexpression dans quatre cas. L'augmentation du nombre de copies de l'*EGFR* était présente dans la moitié des ITACs. Elle était la conséquence d'une amplification génique seulement dans trois cas. Cette amplification était toujours de distribution hétérogène, limitée à quelques foyers tumoraux. En IHC, la surexpression protéique était elle aussi de distribution focale. Dans notre série, les foyers tumoraux présentant une amplification génique de l'*EGFR* présentaient aussi une surexpression protéique de l'EGFR. En conséquence, l'IHC, une technique simple, pourrait permettre de cibler les zones tumorales à analyser en FISH.

La surexpression protéique de l'EGFR semblait impliquer la forme complète de l'EGFR (HER1). En effet, nous avons obtenu des résultats similaires en IHC avec des anticorps anti-EGFR dirigés contre les domaines extracellulaire et intracellulaire. Dans deux cas, la présence de la forme phosphorylée de l'EGFR dans des zones tumorales amplifiées et surexprimant le récepteur, était en faveur d'une activation de la voie de signalisation de l'EGFR. Cette voie n'était donc peut-être pas activée dans les ITACs n'exprimant pas cette forme phosphorylée de l'EGFR. Cependant l'EGFR peut être phosphorylé sur d'autres sites, non reconnus par l'anticorps que nous avons utilisé. De plus, d'autres mécanismes d'activation de l'EGFR ont été décrits comme l'hétérodimérisation de l'EGFR avec d'autres récepteurs tyrosine kinase tels que HER2-3-4 et MET^{56,102,119}. Un autre mécanisme important de régulation de la voie de signalisation de l'EGFR est représenté par l'internalisation du récepteur. Après activation de l'EGFR par son ligand, le récepteur est internalisé dans des endosomes. Selon la nature de ce ligand, il sera soit détruit par des enzymes lysosomales, soit recyclé à la membrane plasmique¹²⁰. Cette internalisation du récepteur pourrait expliquer l'association d'un marquage membranaire et cytoplasmique qu'on a souvent observé en IHC.

Contrairement à l'amplification génique de l'*EGFR*, les cellules tumorales présentant une polysomie du chromosome 7 étaient distribuées d'une manière plus homogène dans le tissu tumoral ; il n'y avait pas d'association avec l'expression protéique de l'*EGFR* ; et il n'y avait pas d'expression protéique de la forme phosphorylée de l'*EGFR*. L'amplification génique et la polysomie sont deux mécanismes biologiques différents conduisant tous les deux à une augmentation du nombre de copies du gène. L'amplification d'un oncogène est une étape cruciale dans la transformation maligne et peut parfois être impliquée dans la résistance secondaire à une thérapeutique^{68,121}. La polysomie reflète plutôt une instabilité chromosomique intrinsèque aux cellules tumorales et n'a pas la même significativité biologique en terme de pronostic ou de réponse thérapeutique¹²¹. Une étude complémentaire en FISH de cinq ITACs de notre série a montré une association fréquente de polysomie des chromosomes 7, 12 et 17 (**Annexe 2**) suggérant des aneuploïdies complexes des ITACs, en accord avec la littérature¹²². Les études clinico-pathologiques devraient donc distinguer ces deux altérations cytogénétiques.

En plus de leurs similitudes morphologiques, les ITACs et les CCRs partagent certaines altérations de la voie de signalisation de l'*EGFR*. Dans notre série, 8,3 % des cas présentaient une amplification de l'*EGFR* et 41,6 % une polysomie du chromosome 7. Ces données sont en accord avec celles de la littérature des ITACs (amplification dans 8 à 14 % des cas et polysomie dans 33 à 46 % des cas^{44,65}) et avec celle des CCRs (amplification absente à 51 % des cas et polysomie dans au moins 30 % des cas⁶³). De plus, les ITACs et les CCRs semblent partager un même modèle d'expression de l'*EGFR*, c'est-à-dire une distribution focale de l'amplification génique de l'*EGFR* se superposant aux foyers surexprimant l'*EGFR*^{70,71}. Une hétérogénéité intra-tumorale a été rapportée dans les CCRs de stade tumoral avancé, et pourrait contribuer à certaines résistances et échecs thérapeutiques^{123,124}. Dans notre série, les foyers tumoraux avec amplification génique de l'*EGFR* et surexpression protéique de l'*EGFR* étaient observés dans des ITACs de stade tumoral avancé (T3 ou T4). Leur valeur prédictive reste à être explorée.

Les mutations de l'*EGFR* sont rares dans notre série, ce qui est en accord avec les études précédentes d'ITACs⁴⁴ et de CCRs⁷⁸. A notre connaissance, notre étude a montré pour la première fois l'absence d'implication de l'*EGFRvIII* mutant dans l'oncogenèse des ITACs. Il en est de même dans les CCRs⁷⁵, contrairement à d'autres types tumoraux⁷⁴. La faible fréquence de mutation de *KRAS* et *BRAF* dans notre série (quatre tumeurs différentes) est en accord avec la littérature^{44,45,81}. Les mutations de *KRAS* et *BRAF* sont plus fréquentes dans les CCRs (respectivement 30 % et 12 % des cas)^{7,79}.

Dans notre étude, une analyse multivariée a identifié uniquement la qualité de l'exérèse tumorale comme facteur pronostique en terme de survie globale, comme décrit précédemment⁴. Comme Garcia et al⁴⁴, nous n'avons pas trouvé d'association entre les différents marqueurs moléculaires étudiés et la survie globale et sans progression.

En conclusion, notre étude a montré plusieurs patterns d'expression de l'*EGFR* dans les ITACs, ce qui témoigne d'une hétérogénéité tumorale. L'analyse en FISH de l'*EGFR* devrait être précédée par une étude IHC et permet de distinguer l'amplification de l'*EGFR* de la polysomie du chromosome 7, un mécanisme différent d'augmentation du nombre de copies de l'*EGFR*. En plus de leurs similitudes morphologiques, les ITACs et les CCRs partagent certaines altérations de la voie de signalisation de l'*EGFR*, telles que l'amplification de l'*EGFR*, la surexpression protéique de l'*EGFR*, l'absence d'implication de l'*EGFRvIII* mutant et de rares mutations de l'*EGFR*. Cependant, contrairement à ce qui est observé dans les CCRs, les mutations de *KRAS* et *BRAF* sont rares dans les ITACs, ce qui constitue une importante différence entre ces deux types tumoraux.

La taille de notre série ne nous a pas permis d'évaluer précisément la valeur pronostique de l'amplification de l'*EGFR* qui semble être un événement assez rare dans ce type de tumeur. De même, en raison du faible nombre de tumeurs dans lesquelles l'*EGFR* est amplifié, il est difficile d'affirmer que la surexpression protéique est liée à la seule amplification génique et non pas à un autre mécanisme comme une polysomie du chromosome 7. De plus, d'autres récepteurs à des facteurs de croissance tels que MET et HER2 peuvent interagir avec la voie de l'*EGFR*. Tout ceci nous a conduits à réaliser une étude complémentaire sur série de 72 ITACs.

5. Etude de l'EGFR, de MET et d'HER2 dans une série complémentaire de 72 ITACs

5.1. Objectifs

Notre objectif principal était d'évaluer la valeur pronostique de l'amplification de l'*EGFR* dans les ITACs et son association avec la surexpression protéique de l'EGFR.

Nos objectifs secondaires étaient d'évaluer l'association et la valeur pronostique d'autres acteurs moléculaires potentiellement en interaction avec la voie de signalisation de l'EGFR : MET et HER2.

Dans ce but, nous avons réalisé dix blocs de *tissue microarray* (TMA) regroupant une série complémentaire de 72 ITACs. Nous avons ensuite analysé sur ces blocs de TMA l'expression protéique de l'EGFR (EGFR_{DEC} et EGFR_{DIC}), de MET et d'HER2 en IHC. Le nombre de copies de l'*EGFR* et de *MET* a été quantifié par HIS. Les résultats de cette série, après avoir été complétés avec ceux de notre série précédente (**Annexe 1**)¹¹⁴, ont été analysés en fonction des données cliniques, histologiques et de survies (globale et sans progression).

5.2. Matériels et méthodes

5.2.1. Patients et prélèvements tissulaires

Les prélèvements tissulaires ont été obtenus à partir de 72 patients opérés au CHU de Limoges pour un ITAC, entre 1988 et 2013. Les patients présentant un antécédent de CCR ont été exclus.

Quarante-huit cas ont été fixés dans du formol à 10 % et 24 dans du liquide de Bouin, pendant 12 à 24 h. Ces prélèvements ont été par la suite déshydratés, imprégnés et inclus en paraffine.

Des coupes de 4 à 5 µm d'épaisseur ont été réalisées puis colorées à l'HES, par le PAS et au bleu alcian. Le type histologique a été défini selon la classification de l'OMS et le sous-type histologique selon celle de Barnes³.

Les données cliniques et de survies ont été obtenues rétrospectivement. Le recueil des échantillons a été effectué conformément aux dispositions de la loi de Bioéthique de 2004. Les données cliniques, histologiques et de survie de la série précédente de 39 ITACs¹¹⁴ ont été actualisées et intégrées aux analyses statistiques.

5.2.2. Réalisation des blocs de tissu microarray

Le premier spot de chaque bloc de TMA correspondait à une muqueuse respiratoire non tumorale. La sélection des autres spots a été faite sur lame d'IHC selon l'intensité de marquage avec les anticorps anti-EGFR_{DEC} et EGFR_{DIC} et selon la densité tumorale des 72 ITACs complémentaires.

Comme décrit précédemment¹¹⁴, l'IHC avec les anticorps anti-EGFR a été réalisée d'une manière automatisée (BenchMark XT ICH/ISH, Ventana), selon les recommandations du fournisseur, sur coupes de 4 à 5 µm d'épaisseur provenant d'un bloc tumoral inclus en paraffine ; et l'intensité du marquage anti-EGFR a été interprétée comme suit : négatif (0), faible (1+), modéré (2+), fort (3+).

Pour chaque cas et chaque anticorps (anti-EGFR_{DEC} et EGFR_{DIC}), deux lecteurs ont sélectionné de manière indépendante des zones tumorales, de 2 mm de diamètre, d'intensité de marquage 0 et/ou 1+ et/ou 2+ et/ou 3+. Deux à six zones (en moyenne trois) par tumeur ont été sélectionnées.

Les TMA ont été construits sur un MiniCore Tissue Arrayer (Excilone, Plaisir, France) à l'aide des logiciels TMADesigner 2 (Excilone) et MiniCore ControlStation (Excilone). Dix blocs de TMA ont été réalisés. Ils mesuraient chacun 32 x 22 mm et comportaient entre 19 et 23 spots de 2 mm de diamètre, espacés entre eux de 2 mm. Ils comportaient 221 spots au total (10 spots non tumoraux et 211 spots tumoraux).

5.2.3. Analyse de l'expression protéique de l'EGFR, de MET et d'HER2 par IHC

L'IHC a été réalisée sur des coupes de 4 à 5 µm d'épaisseur à partir des blocs de TMA d'une manière automatisée (BenchMark XT ICH/ISH, Ventana) selon les recommandations du fournisseur.

Les anticorps suivants ont été testés : anti-EGFR_{DEC} (Clone 3C6, prêt à l'emploi ; Ventana ; **Tableau 3**), anti-EGFR_{DIC}, (Clone EGFR.25, dilution au 1/50^{ième} ; Novocastra ; **Tableau 3**), anti-MET (Clone SP44, prêt à l'emploi ; Ventana) et anti-HER2 (polyclonal, dilution au 1/1000^{ième} ; Dako).

Le marquage anti-EGFR a été interprété comme précédemment^{60,65,114} : négatif (0) ; marquage faible (1+) membranaire, cytoplasmique ou les deux ; marquage modéré (2+) membranaire, fréquemment associé à un marquage cytoplasmique de plus faible intensité ; marquage fort (3+) membranaire, habituellement associé à un marquage cytoplasmique de plus faible intensité.

Le marquage anti-MET a été interprété selon Spigel et al¹²⁵⁻¹²⁷ : négatif (0), absence de marquage ou marquage équivoque membranaire et/ou cytoplasmique < 50 % ; négatif (1+), marquage faible membranaire et/ou cytoplasmique d'au moins 50 % des cellules tumorales ; positif (2+), marquage modéré membranaire et/ou cytoplasmique d'au moins 50 % des cellules tumorales ; positif (3+) marquage fort membranaire et/ou cytoplasmique d'au moins 50 % des cellules tumorales.

Le marquage anti-HER2 a été interprété selon le score appliqué dans les adénocarcinomes gastriques¹²⁸ : négatif (0), aucun marquage ou marquage < 10 % des cellules tumorales ; négatif (1+), marquage membranaire incomplet faible dans au moins 10 % des cellules tumorales ; équivoque (2+), marquage membranaire complet (basolatéral ou latéral) faible à modéré dans au moins 10 % des cellules tumorales ; positif (3+), marquage membranaire complet (basolatéral ou latéral) fort dans au moins 10 % des cellules tumorales.

Sur le plan technique, le marquage de l'épithélium respiratoire servait de témoin positif pour les anticorps anti-EGFR, anti-MET et anti-HER2^{115,129}. Deux témoins externes d'intensité 3+ ont été utilisés avec les anticorps anti-MET et anti-HER2, provenant respectivement d'un adénocarcinome pulmonaire avec amplification de *MET* et d'un carcinome canalaire infiltrant mammaire avec amplification d'*ERBB2*.

Un score a été donné pour chaque spot. Le score le plus élevé a été retenu pour chaque tumeur. Une forte intensité de marquage (3+) a été considérée comme une surexpression.

5.2.4. Analyse du nombre de copies de l'EGFR et de MET par hybridation in situ

L'analyse du nombre de copies de l'*EGFR* a été réalisée sur coupes en paraffine de 3 à 4 µm d'épaisseur provenant des blocs de TMA. La technique de FISH a été effectuée avec la sonde ZytoLight SPEC EGFR/CEN 7 *Dual Color Probe* (Zytovision, Clinisciences) comme précédemment décrit¹¹⁴. La lecture a été réalisée à l'aide d'un microscope à épifluorescence (DM6000, Leica, Nanterre, France) avec filtres adaptés [(DAPI, fluoréscéine isothiocyanate (FITC), tétraméthylrhodamine isothiocyanate (TRITC)], sur une plateforme Cytovision 7.3 (Leica). Pour chaque spot, au moins 50 noyaux interphasiques non superposés, ont été analysés sur au moins trois champs à fort grossissement.

Les critères d'interprétations étaient ceux précédemment décrits^{44,65,114,116} : (1) amplification de l'*EGFR* [au moins un des critères suivants : ratio moyen de l'ensemble des noyaux analysés $EGFR/CEN\ 7 \geq 2$, amas d'*EGFR* (au moins quatre copies d'*EGFR* rapprochées) dans au moins 10 % des noyaux analysés, au moins quinze copies d'*EGFR* dans au moins 10 % des noyaux analysés]¹¹⁶ ; (2) polysomie du chromosome 7 (au moins trois copies de CEN 7 dans plus de 30 % des noyaux analysés)^{44,65} ; (3) absence d'augmentation du nombre de copies d'*EGFR* (absence d'amplification d'*EGFR* et de polysomie du chromosome 7).

L'analyse du nombre de copies de *MET* a été réalisée sur coupes en paraffine de 3 à 4 µm des blocs de TMA par technique de *dual in situ hybridization* (DISH) avec la sonde INFORM MET DNA Probe (Ventana) d'une manière automatisée (BenchMark XT ICH/ISH, Ventana) selon les recommandations du fournisseur. Les étapes de la technique ont été : déparaffinage, protéolyse thermique (*Cell conditioning* 2) et enzymatique (Protéase 3), dénaturation de l'ADN pendant 20 min à 80°C, hybridation pendant 6 heures, lavage de stringence, révélation à l'argent et au chromogène rouge rapide, contre coloration à l'hématoxyline, lavage et montage des lames en milieu non aqueux. Pour chaque spot, au moins 50 noyaux interphasiques non superposés, ont été analysés sur au moins trois champs à fort grossissement.

Trois catégories ont été définies : (1) amplification de *MET* [au moins un des critères suivants : ratio moyen de l'ensemble des noyaux analysés $MET/CEN\ 7 \geq 2$, amas de *MET* (au moins quatre copies de *MET* rapprochées) dans au moins 10 % des noyaux analysés, au moins quinze copies de *MET* dans au moins 10 % des noyaux analysés]^{116,130} ; (2) polysomie du chromosome 7 (au moins trois copies de CEN 7 dans plus de 30 % des noyaux analysés)^{44,65} ; (3) absence d'augmentation du nombre de copies de *MET* (absence d'amplification de *MET* et de polysomie du chromosome 7).

Un score a été donné pour chaque spot. Le score le plus élevé a été retenu pour chaque patient [(1) amplification génique et/ou (2) polysomie du chromosome 7 ou (3) absence d'amplification et de polysomie du chromosome 7].

5.2.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec les logiciels StatView 5.0 (SAS Institute, Inc, Cary, NC) et R 2.10.1 (Department of Biometry and Evolutionary Biology, Lyon, France). Les corrélations entre les variables quantitatives ont été réalisées par le test de Spearman. Les comparaisons entre les variables qualitatives ont été réalisées par le test exact de Fisher. Les comparaisons de moyennes ont été réalisées par les tests non paramétriques de Mann-Whitney (pour deux variables) ou de Kruskal-Wallis (pour plus de deux variables). Les analyses de la survie globale et de la survie sans progression ont été effectuées par la méthode de Kaplan-Meier. Les comparaisons des courbes de survie entre les groupes ont été faites au moyen de test du Logrank. Les analyses multivariées avec choix des covariables fait par une procédure descendante ont été réalisées en utilisant le modèle de régression de Cox. Le seuil de significativité retenu a été fixé à 5 %.

5.3. Résultats

5.3.1. Caractéristiques des 111 patients, synthèse des deux séries

Les données cliniques et histopathologiques de l'ensemble des deux séries (111 cas) sont présentées dans le **Tableau 9**.

Les sous-types histologiques étaient représentés par six papillaires, 61 coliques, 21 mucineux et 23 mixtes. Le sous-type mixte était constitué dans tous les cas de deux composantes : le contingent majoritaire était par ordre de fréquence colique, mucineux et papillaire et le contingent minoritaire colique, mucineux, papillaire et solide (**Figure 19**).

Au total douze ITACs avaient un contingent papillaire, 83 un contingent colique, deux un contingent solide, et 37 un contingent mucineux dont 31 avec un contingent à cellules en bague à chaton.

Les sous-types histologiques de la série selon Barnes n'étaient pas associés aux données démographiques et cliniques.

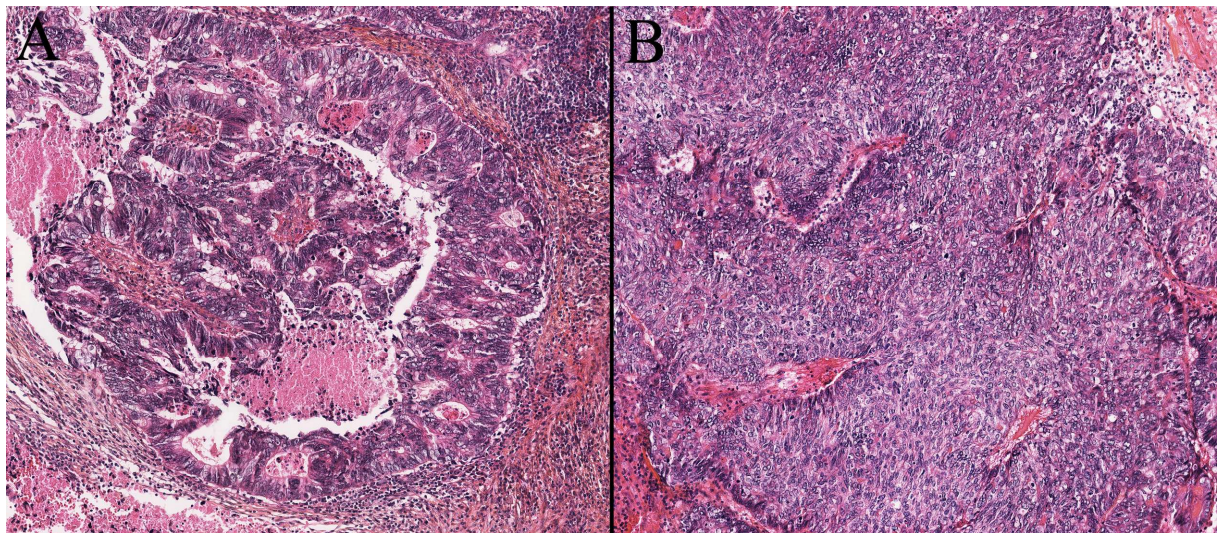


Figure 19. ITAC de sous-type mixte avec contingent colique (A) et solide (B), (HES x200, Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

Tableau 9. Données cliniques et histopathologiques des 111 patients.

Sous-types histologiques selon Barnes		Tous	Papillaire	Colique	Mucineux	Mixte
Nombre (n) de cas		n = 111	n = 6	n = 61	n = 21	n = 23
Age médian (années)	43 à 67	55	2	31	12	10
	68 à 87	56	4	30	9	13
Sexe	Homme	107	6	58	21	22
	Femme	4	0	3	0	1
Localisation	Ethmoïde	106	6	57	20	23
	Fosses nasales	5	0	0	1	0
Exposition aux poussières de bois	Oui	97	5	51	20	21
	Non	12	1	8	1	2
	NC	2	0	2	0	0
Stade tumoral (T) selon la classification TNM 2009 de l'UICC	T1	2	0	2	0	0
	T2	56	4	37	9	6
	T3	26	1	12	5	8
	T4	27	1	10	7	9
Type de chirurgie	Mixte	71	5	36	15	15
	Paralatéronasale	19	0	11	4	4
	Endoscopique	15	1	10	2	2
	NC	6	0	4	0	2
Exérèse chirurgicale	Complète	100	6	54	20	20
	Incomplète	6	0	4	1	1
	NC	5	0	3	0	2
Radiothérapie complémentaire	Oui	105	6	58	21	20
	Non	4	0	2	0	2
	NC	2	0	1	0	1
Chimiothérapie complémentaire à base de sel de platine	Oui	9	0	5	1	3
	Non	100	6	55	20	19
	NC	2	0	1	0	1

NC pour non connu

5.3.2. Expression protéique de l'EGFR, de MET et d'HER2 en

IHC, étude des 72 ITACs complémentaires organisés en TMA

Les résultats de l'analyse en IHC de la série complémentaire (72 cas) avec les anticorps anti-EGFR_{DEC}, anti-EGFR_{DIC}, anti-MET et anti-HER2, selon la plus forte intensité de marquage de chaque tumeur, sont donnés dans le **Tableau 10**.

Tableau 10. Expression protéique en IHC de l'EGFR_{DEC}, l'EGFR_{DIC}, MET et d'HER2 selon la plus forte intensité de marquage de chaque tumeur de la série complémentaire des 72 cas.

	EGFR _{DEC}	EGFR _{DIC}	MET	HER2
	n = 72	n = 70	n = 69	n = 71
3+	3	3	12	2
2+	15	1	32	28
1+	40	20	13	14
0	14	46	12	27

Analyse de l'EGFR en IHC (Figure 20)

Sur l'analyse de l'EGFR en IHC des 201 spots de TMA interprétables (correspondant à 72 cas) avec l'anti-EGFR_{DEC} et des 193 spots interprétables (correspondant à 70 cas) avec l'anti-EGFR_{DIC}, 58 cas (81 %) étaient positifs (score 1+/2+/3+) avec les anticorps anti-EGFR_{DEC} et/ou EGFR_{DIC}. Il s'agissait de trois sous-types papillaires, 32 coliques, neuf mucineux et quatorze mixtes. Les quatorze cas restants étaient négatifs (score 0) avec ces deux anticorps.

Nous avons observé une hétérogénéité intra-tumorale du marquage anti-EGFR avec au moins deux intensités de marquage dans 41 % des cas. Il existait une corrélation modérée entre les intensités de marquage des anticorps anti-EGFR_{DEC} et anti-EGFR_{DIC} par spot de TMA ($P < 0,0001$; $\rho = 0,49$). On observait toujours une stricte correspondance entre les zones tumorales présentant un fort marquage anti-EGFR_{DEC} et anti-EGFR_{DIC} (six spots correspondant à trois cas ; $P < 0,0001$). Ces trois cas (4 %) avec fort marquage anti-EGFR correspondaient à deux sous-types coliques et un mixte. Les spots avec marquage modéré (2+) anti-EGFR_{DEC} étaient dans 89 % des cas de score 0 ou 1+ avec l'anti-EGFR_{DIC}. De même, les spots avec marquage faible (1+) anti-EGFR_{DEC} ne présentaient pas de marquage anti-EGFR_{DIC} dans 67 % des cas.

Il n'y avait pas d'association entre le marquage anti-EGFR et les données démographiques, cliniques et histologiques.

Analyse de MET en IHC (Figure 21)

Sur l'analyse de MET en IHC des 191 spots de TMA interprétables (correspondant à 69 cas), 44 cas (64 %) étaient positifs (score 2+/3+), dont douze (17 %) avaient un fort marquage (3+). Les 25 cas restants étaient négatifs (score 0/1+). Les cas positifs correspondaient à trois sous-types papillaires, 24 coliques, six mucineux et onze mixtes. Les cas avec une surexpression de MET correspondaient à deux sous-types papillaires, neuf coliques et un mixte. Aucune tumeur de sous-type mucineux ne présentait de surexpression de MET ($P < 0,0001$).

Nous avons observé dans 25 % des cas une hétérogénéité intra-tumorale du marquage anti-MET avec au moins deux intensités de marquage. L'intensité de marquage anti-MET était modérément corrélée à celle des marquages anti-EGFR_{DEC} ($P = 0,002$; $\rho = 0,37$) et anti-EGFR_{DIC} ($P = 0,0001$; $\rho = 0,37$) par spot de TMA. Aucun des spots avec une surexpression de MET ne présentait de surexpression de l'EGFR ($P = 0,31$).

Il n'y avait pas d'autre association entre le marquage anti-MET et les données démographiques, cliniques et histologiques.

Analyse d'HER2 en IHC (Figure 22)

Sur l'analyse d'HER2 en IHC des 194 spots de TMA interprétables (correspondant à 71 cas), 30 cas (42 %) étaient positifs ou équivoques (score 2+/3+), dont deux (3 %) avaient un fort marquage. Les 41 cas restants étaient négatifs (score 0/1+). Les cas positifs correspondaient à trois sous-types papillaires, quinze coliques, cinq mucineux et sept mixtes. Les cas avec une surexpression d'HER2 correspondaient à un sous-type colique et un mucineux.

On a observé une hétérogénéité intra-tumorale du marquage anti-HER2 avec au moins deux intensités de marquage dans 34 % des cas. L'intensité de marquage anti-HER2 était modérément corrélée à celle des marquages anti-EGFR_{DEC} ($P = 0,002$; $\rho = 0,36$) et anti-EGFR_{DIC} ($P = 0,0002$; $\rho = 0,27$) par spot de TMA. Aucun des spots avec une surexpression d'HER2 ne présentait de surexpression de l'EGFR ($P = 0,62$) ni de MET ($P = 0,32$).

Il n'y avait pas d'association entre le marquage anti-HER2 et les données démographiques, cliniques et histologiques.

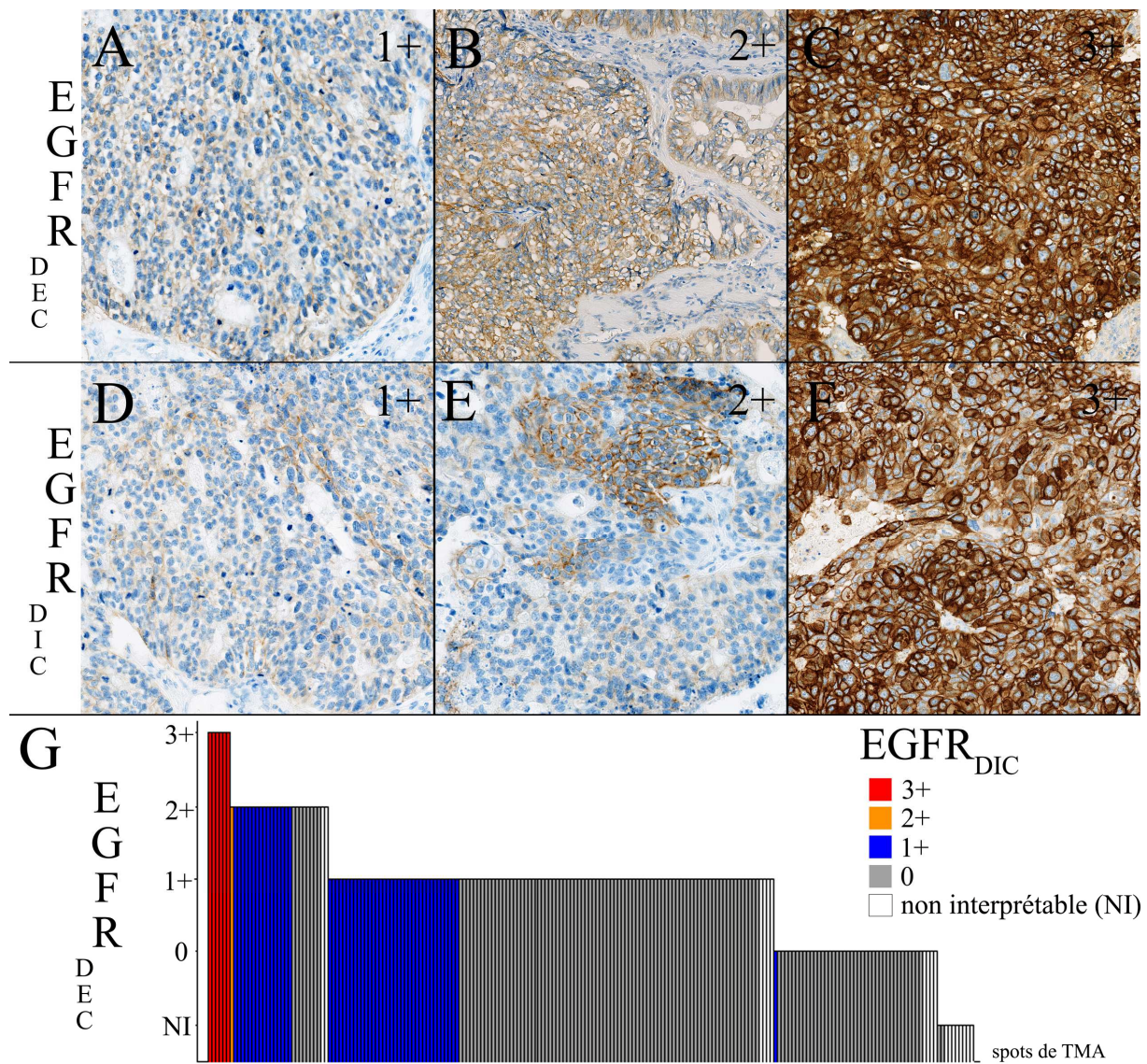


Figure 20. Etude en IHC avec les anticorps anti-EGFR_{DEC} [1+ (A), 2+ (B), 3+ (C)] et anti-EGFR_{DIC} [1+ (D), 2+ (E), 3+ (F)] ; synthèse des résultats sur les 191 spots interprétables de TMA (G). La surexpression (3+) de l'EGFR_{DEC} était fortement associée à celle de l'EGFR_{DIC} ($P < 0,0001$).

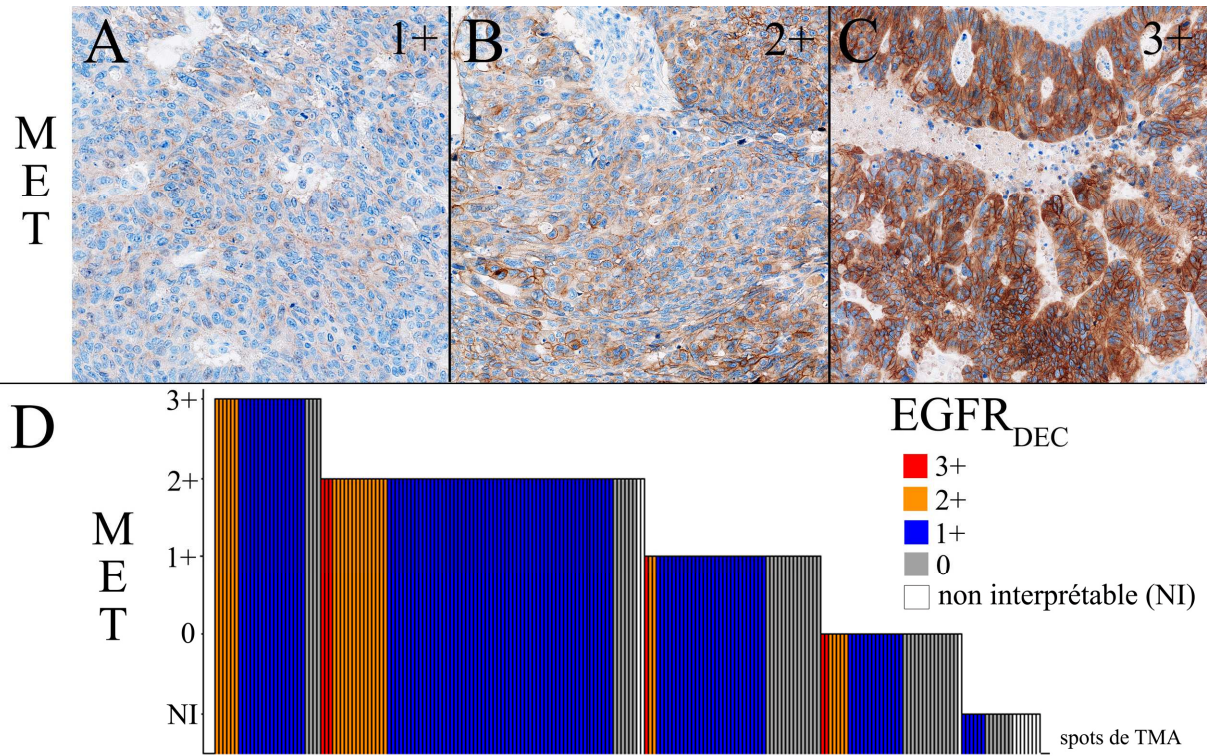


Figure 21. Etude en IHC avec les anticorps anti-MET [1+ (A), 2+ (B), 3+ (C)] et anti-EGFR_{DEC} ; synthèse des résultats sur les 188 spots interprétables de TMA (D).

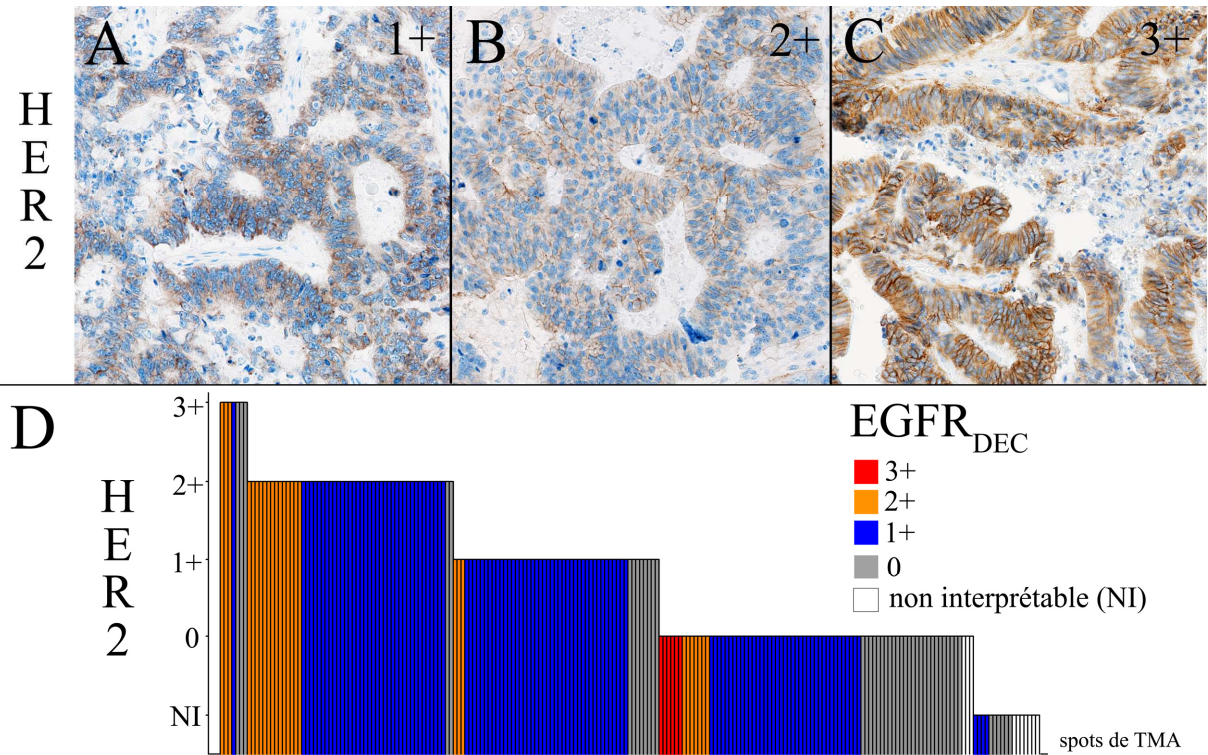


Figure 22. Etude en IHC d'HER2 [1+ (A), 2+ (B), 3+ (C)] et de l'EGFR_{DEC} ; synthèse des résultats sur les 191 spots interprétables de TMA (G).

5.3.3. Nombre de copies de l'EGFR et de MET par HIS, étude

des 72 ITACs complémentaires organisés en TMA

Les résultats de l'analyse de l'EGFR et MET par HIS, selon le plus fort score pour chaque tumeur de la série complémentaire organisée en TMA, sont donnés dans le **Tableau 11**.

Tableau 11. Résultats de l'analyse de l'EGFR et de MET par HIS selon le plus fort score de chaque tumeur de la série complémentaire des 72 cas.

	<i>EGFR</i>	<i>MET</i>
	n = 58	n = 50
Amplification avec polysomie CEN 7	2	0
Amplification sans polysomie CEN 7	1	0
Polysomie CEN 7 sans amplification	27	26
Absence de gain (*)	28	24
(*) : Absence d'amplification génique et de polysomie du chromosome 7.		

Analyse de l'EGFR en FISH (Figure 23)

Sur l'analyse de l'EGFR en FISH des 152 spots de TMA interprétables (correspondant à 58 cas), 30 cas (52 %) présentaient une augmentation du nombre de copies de l'EGFR. Trois cas (5 %) présentaient une amplification génique de l'EGFR, deux d'entre eux présentaient aussi une polysomie du chromosome 7. Les 27 autres cas (47 %) présentaient une polysomie du chromosome 7 sans amplification génique de l'EGFR. Les cas amplifiés correspondaient à un sous-type colique, un mucineux et un mixte.

Cette analyse a montré une hétérogénéité intra-tumorale de l'amplification dans deux cas sur trois. La répartition de la polysomie du chromosome 7 était homogène dans 90 % des cas. L'amplification de l'EGFR était fortement associée à la surexpression protéique de l'EGFR_{DEC} et de l'EGFR_{DIC} ($P < 0,0001$).

Les spots avec amplification de l'EGFR correspondaient à des spots de score 0, 1+ ou 2+ en IHC avec l'anticorps anti-MET ($P = 0,59$) et correspondaient à des spots de score 0 en IHC avec l'anticorps anti-HER2 ($P = 0,03$). La polysomie du chromosome 7 n'était pas associée à l'expression protéique de l'EGFR_{DEC} ($P = 0,21$), de l'EGFR_{DIC} ($P = 0,13$), de MET ($P = 0,7$) ni d'HER2 ($P = 0,53$).

Il n'y avait pas d'association significative entre l'amplification de l'*EGFR* ou la polysomie du chromosome 7 et les données démographiques, cliniques et histologiques.

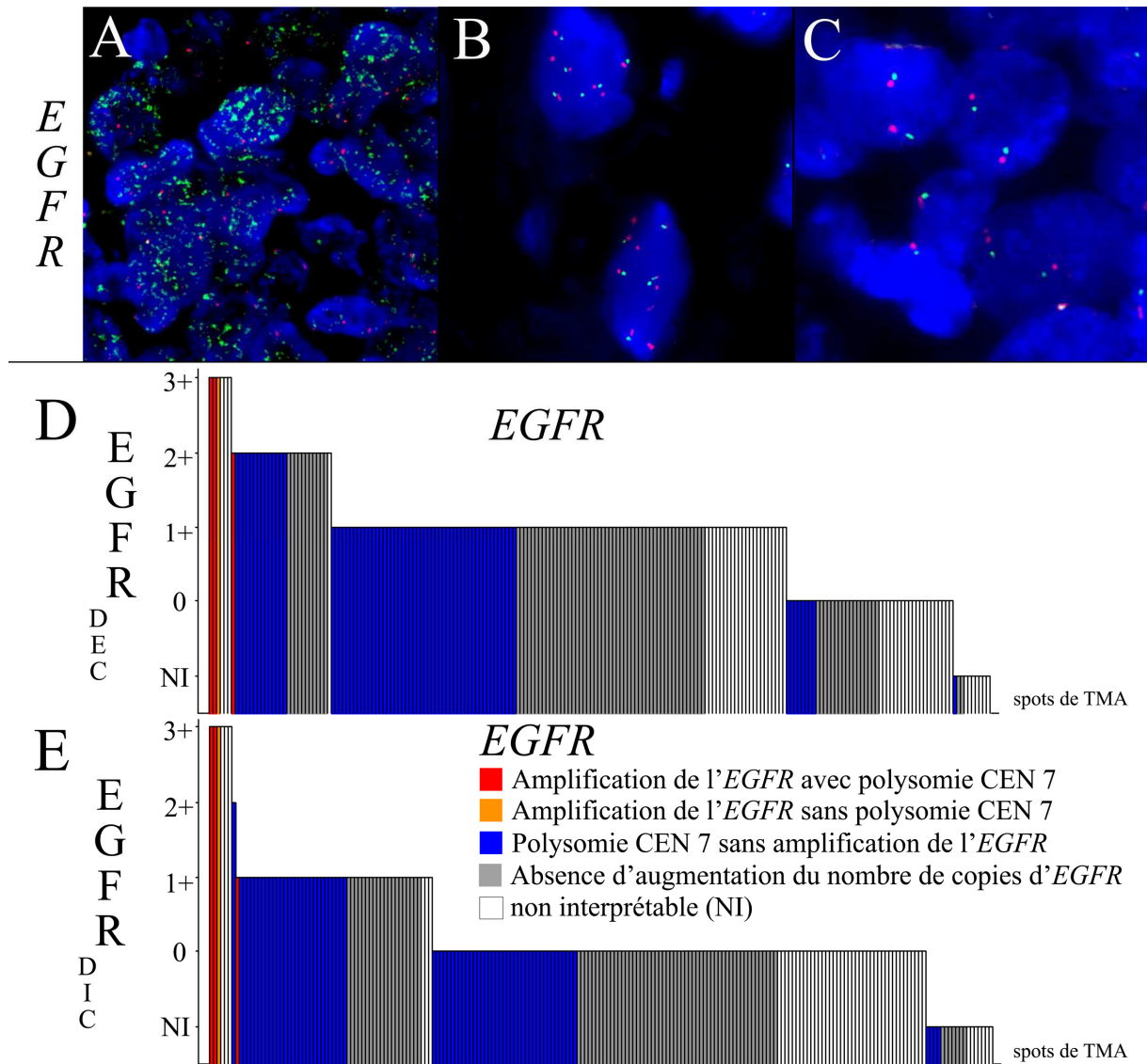


Figure 23. Etude du nombre de copies de l'*EGFR* en FISH [amplification génique (A), polysomie CEN7 (B) et absence de gain (C)] ; synthèse des résultats comparativement à l'étude en IHC de l'*EGFR*_{DEC} (D) et de l'*EGFR*_{DIC} (E), respectivement sur les 155 et 147 spots interprétables de TMA. L'amplification de l'*EGFR* était fortement associée à la surexpression protéique de l'*EGFR*_{DEC} et de l'*EGFR*_{DIC} ($P < 0,0001$).

Analyse de *MET* en DISH (Figure 24)

Sur l'analyse de *MET* en DISH des 134 spots de TMA interprétables (correspondant à 50 cas), aucun cas ne présentait d'amplification de *MET*, et 26 cas (52 %) présentaient une polysomie du chromosome 7.

Comme indiqué précédemment, la polysomie du chromosome 7 n'était pas associée à l'expression protéique de *MET* ($P = 0,7$).

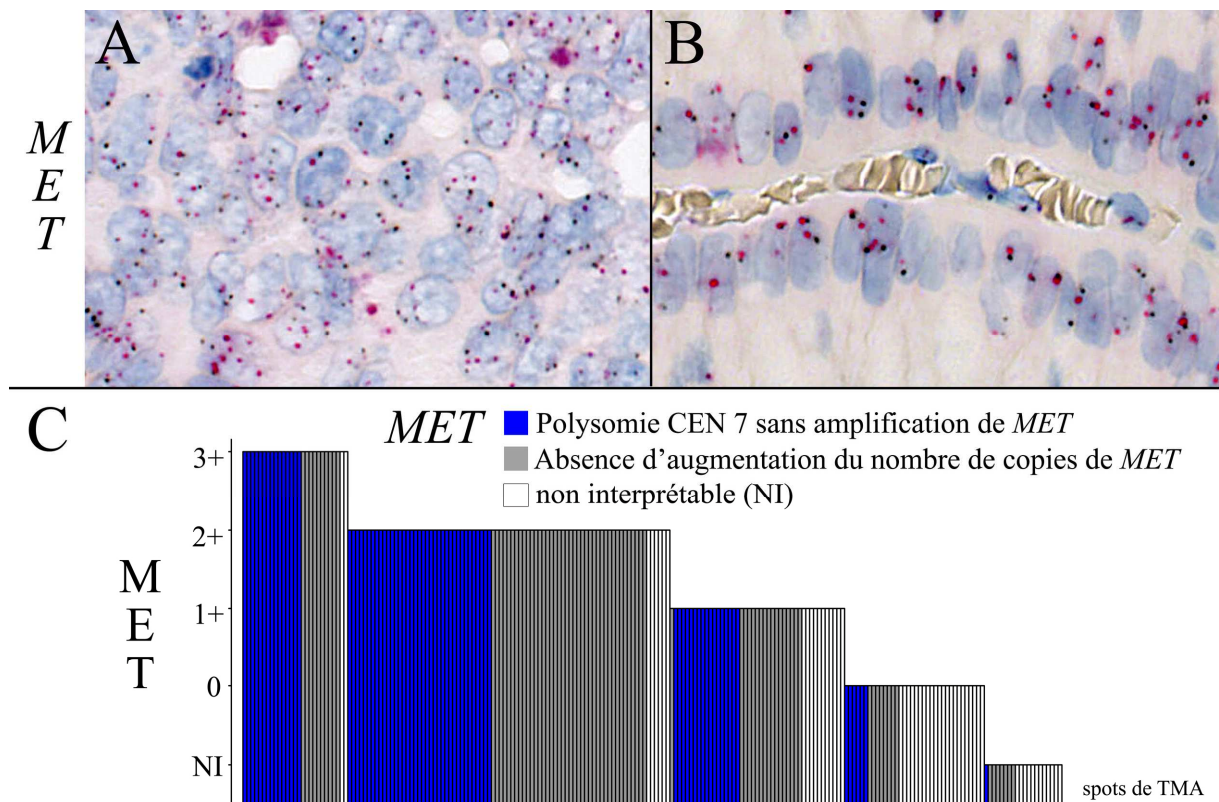


Figure 24. Etude du nombre de copies de *MET* en DISH [polysomie CEN7 (A) et absence de gain (B)]; synthèse des résultats comparativement à l'étude en IHC de *MET*, sur les 150 spots interprétables de TMA (C).

5.3.4 Expression protéique de l'EGFR et nombre de copies de l'EGFR des 111 ITACs, synthèse des deux séries

Sur l'analyse de l'EGFR en IHC de l'ensemble des deux séries (111 cas), 83 cas (75 %) étaient positifs avec les anticorps anti-EGFR_{DEC} et/ou EGFR_{DIC}. Il s'agissait de six sous-types papillaires, 46 coliques, douze mucineux et 19 mixtes. Les 28 tumeurs restantes (25 %) étaient négatives avec ces deux anticorps. Sept tumeurs avaient un fort marquage anti-EGFR_{DEC} et anti-EGFR_{DIC} et correspondaient à six sous-types coliques et un mixte.

Sur l'analyse de l'EGFR en FISH de l'ensemble des deux séries (111 cas), 48 cas (51 %) présentaient une augmentation du nombre de copies de l'EGFR sur les 94 cas interprétables. Six cas (6 %) présentaient une amplification génique de l'EGFR, quatre d'entre eux présentaient aussi une polysomie du chromosome 7. Les 42 autres cas (44 %) présentaient une polysomie du chromosome 7 sans amplification génique de l'EGFR. Les cas amplifiés correspondaient à quatre sous-types coliques, un mucineux et un mixte.

Il n'y avait pas d'association significative entre le marquage anti-EGFR ou l'amplification de l'EGFR ou la polysomie du chromosome 7 et les données démographiques, cliniques et histologiques.

5.3.5. Relation avec la survie globale et sans progression, synthèse des deux séries

Au moment de l'analyse, la médiane de la survie globale était de 234,5 mois avec 49 décès (45 %), et la médiane de la survie sans progression était de 355,3 mois avec 40 progressions [36 % ; 33 loco-régionales (83 %) et sept métastases à distance (cinq osseuses, une cérébrale et une pulmonaire)]. La survie globale à 5 ans était de 76 % et celle sans progression était de 69 %.

La survie globale était plus faible dans les cas suivants : âge supérieur à 67 ans ($P = 0,003$), exérèse tumorale incomplète ($P = 0,008$), stade tumoral avancé (T3/T4) selon la classification TNM 2009 de l'UICC ($P < 0,0001$), et présence d'un contingent histologique mucineux ou solide ($P = 0,03$).

La survie sans progression était plus faible dans les cas suivants : stade tumoral avancé (T3/T4) selon la classification TNM 2009 de l'UICC ($P = 0,0002$), et présence d'un contingent histologique mucineux ou solide ($P = 0,01$).

La survie globale et la survie sans progression n'étaient pas associées aux données suivantes : sexe, localisation tumorale, exposition aux poussières de bois, type de chirurgie, amplification génique de l'*EGFR* et de *MET*, polysomie du chromosome 7, expression protéique de l'*EGFR* ainsi que *MET* et *HER2*.

Une analyse multivariée par le modèle de régression de Cox a montré que la survie globale était plus faible en cas de stade tumoral avancé (T3/T4) selon la classification TNM 2009 de l'UICC ($P = 0,0002$) et d'exérèse tumorale incomplète ($P = 0,05$), et que la survie sans progression était plus faible uniquement en cas de stade tumoral avancé (T3/T4) selon la classification TNM 2009 de l'UICC ($P = 0,0004$).

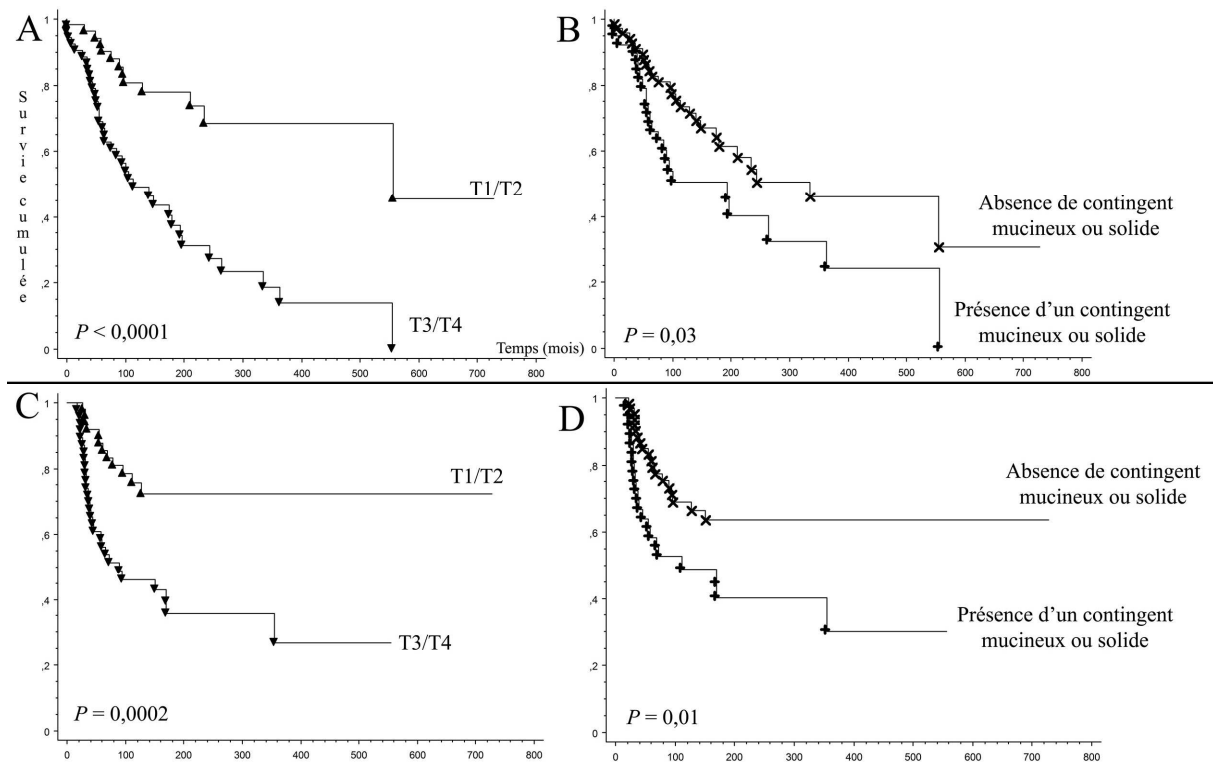


Figure 25. Probabilité de survie globale (A et B) et de survie sans progression (C et D) selon le stade tumoral d'après la classification TNM 2009 de l'UICC (A et C) et la présence ou non d'un contingent histologique mucineux ou solide (B et D).

5.4. Discussion

Compte tenu des similitudes morphologiques et immunophénotypiques qui existent entre les ITACs et les CCRs, l'hypothèse que ces deux types tumoraux pourraient avoir des mécanismes d'oncogenèse communs, impliquant notamment la voie de signalisation de l'EGFR, a été avancée.

En raison de l'hétérogénéité de l'expression de l'EGFR dans les ITACs, décrite dans notre travail antérieur¹¹⁴, une analyse en IHC du bloc tumoral a précédé la construction des TMA permettant d'étudier précisément les différents patterns d'expression de l'EGFR selon le nombre de copies de l'*EGFR*.

L'étude de l'EGFR dans cette série plus représentative, a confirmé nos résultats précédents¹¹⁴. L'expression protéique de l'EGFR était fréquente dans les ITACs (75 %). La surexpression protéique de l'EGFR était principalement liée à l'amplification génique de l'*EGFR*. Cet événement était rare (6 %) et de distribution hétérogène dans le tissu tumoral, en étant restreint à des « sous-clones » tumoraux. Il était plutôt observé dans des tumeurs de stade avancé, comme déjà décrit¹¹². Ces notions concernant l'amplification génique de l'*EGFR* sont en faveur d'un événement génétique additionnel dans la carcinogenèse des ITACs. A l'opposé, la polysomie du chromosome 7, observée dans un peu moins de la moitié de notre série, n'était pas associée à l'expression protéique de l'EGFR, et présentait une distribution homogène au sein du tissu tumoral. Cette altération semble plutôt refléter une instabilité chromosomique intrinsèque aux cellules tumorales qu'un mécanisme spécifique de l'oncogenèse¹²¹.

Dans notre étude, on observait au niveau des foyers tumoraux présentant une amplification de l'*EGFR* une superposition des marquages intenses anti-EGFR_{DEC} et anti-EGFR_{DIC}, ce qui suggère que l'amplification du gène implique la forme complète de l'EGFR (HER1). En revanche, de nombreux foyers tumoraux avaient un marquage faible à modéré avec l'anti-EGFR_{DEC} et ne présentaient pas de marquage avec l'anti-EGFR_{DIC}, ce qui pourrait indiquer la présence d'isoformes tronquées (b, c et d) ne possédant pas le domaine intracellulaire du récepteur dans ces foyers tumoraux. Les résultats de notre premier travail ont, à l'appui de cette hypothèse, montré une expression des ARNm EGFRv3 et v4 codant certaines de ces isoformes tronquées¹¹⁴. D'autres études sont nécessaires pour préciser le rôle de ces isoformes dans l'oncogenèse des ITACs.

De nombreux acteurs moléculaires sont en relation avec l'EGFR. Leurs implications dans les processus tumoraux, souvent associées à un mauvais pronostic, expliquent parfois des résistances à des thérapies ciblées anti-EGFR^{56,97,109}. Il peut s'agir des protéines impliquées dans la cascade de signalisation intracellulaire comme les kinases KRAS et BRAF, mais aussi d'autres récepteurs tyrosine kinase tels que MET ou les autres membres de la famille HER. En effet, des interactions et des synergies ont été rapportées entre les voies de signalisation de l'EGFR et de MET^{104,105}, parfois expliquées par une interaction directe entre ces deux récepteurs^{102,103}. D'autre part, une modélisation expérimentale récente a montré la participation prédominante de l'homodimère HER1-HER1 et de l'hétérodimère HER1-HER2 dans la phosphorylation et l'activation de l'EGFR¹¹³.

L'activation de MET entraîne par des voies de signalisation intracellulaire similaires à celles de l'EGFR, des signaux de prolifération, d'invasion, d'angiogenèse et de résistance à l'apoptose¹⁰¹. Son activation dans les processus tumoraux peut s'observer lors d'une surexpression protéique du récepteur notamment en cas d'amplification génique de *MET*, ou en cas de mutations de *MET*, et ce indépendamment de la fixation de son ligand^{100,101}.

A notre connaissance, notre étude est la première à évaluer l'expression protéique de MET et le nombre de copies de *MET* dans les ITACs. Comme dans d'autres types tumoraux, l'expression protéique de MET (2+/3+) était fréquente dans les ITACs (64 %), contrairement à l'amplification génique de *MET* qui était absente dans notre série, et rapportée dans moins de 5 % des cas de ces autres types tumoraux^{107,131-134}. L'amplification de *MET* ne semble donc pas être impliquée dans l'oncogenèse des ITACs et n'explique pas la surexpression protéique (3+) observée dans 17 % de nos cas. Certaines études concernant les adénocarcinomes bronchiques ont rapporté la valeur pronostique péjorative d'une augmentation globale du nombre de copies de *MET* (amplification génique et/ou polysomie du chromosome 7) et son association avec l'expression protéique de MET^{130,131}. Néanmoins, d'autres travaux concernant des adénocarcinomes gastriques et mammaires, n'ont pas montré, comme dans notre étude, de relation entre l'expression protéique de MET et l'augmentation du nombre de copies de *MET* (amplification et/ou polysomie du chromosome 7)^{134,135}. Différents mécanismes d'activation de MET interviendraient selon les types tumoraux. En-dehors de l'augmentation du nombre de copies de *MET*, la surexpression protéique de MET pourrait être liée à deux autres mécanismes. Le premier serait le fait de modulation transcriptionnelle notamment lors d'une activation de RAS¹³⁶, ou par l'intermédiaire de microARN¹³⁵. Le second mécanisme serait l'inhibition de la dégradation de la protéine notamment par mutation du site de fixation juxta-membranaire Y1003 permettant en condition normale, après activation du récepteur, de recruter les protéines impliquées dans son internalisation et sa dégradation^{100,101}. Ces altérations restent à être explorées dans les ITACs.

L'activation d' HER2 décrite dans les carcinomes mammaire et gastrique est principalement liée à une amplification génique conduisant à une surexpression protéique^{128,137}. Cette anomalie, représentant une cible thérapeutique dans ces tumeurs, est évaluée en routine dans les laboratoires de Pathologie en premier lieu par IHC du fait de la bonne corrélation entre la surexpression protéique (3+) et l'amplification génique^{128,137}. Dans les cas intermédiaires une analyse par HIS est réalisée.

Seulement 3 % des tumeurs de notre série présentaient une surexpression (3+) d'HER2, ce qui est comparable aux données de la littérature^{110,111}. De plus, Nazar et al ont rapporté dans une petite série d'ITACs l'absence d'amplification d'*ERBB2*¹¹². En conséquence, il semblerait que la surexpression protéique d'HER2 et l'amplification du gène ne soient pas impliquées dans l'oncogenèse des ITACs. L'analyse dans notre série du nombre de copies d'*ERBB2* est en cours.

Dans notre étude, les foyers tumoraux présentant une surexpression protéique de l'EGFR ne présentaient jamais de surexpression protéique de MET ou d'HER2. Cela suggère qu'il n'y a pas de coopération entre ces différents récepteurs tyrosine kinase lorsqu'ils sont surexprimés. Toutefois, ces observations restent à être précisées par des études expérimentales complémentaires.

Les ITACs et les CCRs partagent des altérations moléculaires communes de la voie de signalisation de l'EGFR. En effet, dans ces deux types tumoraux : l'expression protéique de l'EGFR est fréquente avec seulement quelques cas présentant à la fois une amplification génique de l'*EGFR* et une surexpression protéique de l'EGFR^{60,62,114} ; les mutations de l'*EGFR* sont rares^{75,78,114} ; l'expression protéique de MET est fréquente avec de rares cas présentant une amplification génique de *MET*^{106,107,138,139} ; une polysomie du chromosome 7 est fréquente^{63,114} ; la surexpression protéique d'HER2 est rare¹⁴⁰.

D'autre part, comme dans les CCRs¹³⁸, les tumeurs de sous-type mucineux de notre série se distinguaient des autres sous-types histologiques par l'absence de surexpression protéique de MET. Des spécificités moléculaires liées au « phénotype tumoral mucineux » existeraient, comme le suggèrent quelques études rapportant des dérégulations fréquentes de la protéine d'adhésion E-cadhérine, observées préférentiellement dans les sous-types mucineux de CCRs et d'ITACs^{141,142}.

Cependant, il existe des différences entre la voie de carcinogenèse des ITACs et celle des CCRs¹⁴³, notamment par la faible fréquence des mutations de *KRAS* et *BRAF*^{44,45,81,114}, l'absence de mutation inactivatrice d'*APC*^{88,89} et l'absence d'instabilité des microsatellites⁹². D'une manière plus globale, ces deux types tumoraux semblent avoir leur propre pattern d'anomalie chromosomique, en faveur de deux voies de carcinogenèse différentes^{143,144}.

L'étude de 72 patients supplémentaires a permis d'obtenir une série de 111 patients plus représentative sur le plan clinique. L'analyse multivariée a identifié comme facteur pronostique en terme de survie globale le stade tumoral et la qualité de l'exérèse tumorale, et comme facteur pronostique en terme de survie sans progression uniquement le stade tumoral. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature^{4,25,44,45}. La voie d'abord chirurgicale, notamment endoscopique, n'affectait pas la survie, comme cela a été rapporté par d'autres centres^{47,145,146}. D'autre part, les sous-types histologiques mucineux et solide (peu différencié) semblaient avoir une valeur pronostique péjorative en terme de survie globale et sans progression sur les analyses univariées, comme précédemment rapporté^{3,33,37,111}.

Notre étude n'a pas permis de mettre en évidence de marqueur moléculaire pronostique dans les ITACs. En accord avec Garcia et al⁴⁴, dans notre série de 111 patients atteints d'ITAC, l'expression protéique de l'EGFR et l'augmentation du nombre de copies de l'*EGFR* par amplification génique et/ou par polysomie du chromosome 7 n'affectaient pas la survie. De même, dans notre série complémentaire de 72 patients atteints d'ITAC, l'expression protéique de MET, l'augmentation du nombre de copies de *MET* et l'expression protéique d'HER2 n'avaient pas d'impact sur la survie.

6. Conclusion

Les ITACs sont des tumeurs rares, siégeant principalement au niveau des sinus ethmoïdaux. Leur découverte à des stades tumoraux avancés et leur potentiel de récurrence loco-régional en font des tumeurs de mauvais pronostic, parfois en impasse thérapeutique. Ces tumeurs ont la particularité d'être liées à l'exposition aux poussières de bois. Elles sont définies par leur ressemblance histologique et immunophénotypique avec les CCRs.

Notre étude a révélé dans les ITACs certaines caractéristiques moléculaires communes aux CCRs, concernant la voie de signalisation de l'EGFR et deux autres récepteurs tyrosine kinase potentiellement en interaction avec l'EGFR, MET et HER2.

L'expression protéique de l'EGFR était fréquente (75 %). L'amplification de l'*EGFR* n'a été observée que dans 6 % des cas, et semblait entraîner une surexpression protéique de la forme complète du récepteur (HER1). Sa distribution témoignait d'une hétérogénéité intra-tumorale. L'analyse par FISH permet de distinguer l'amplification du gène d'une polysomie du chromosome 7, un mécanisme différent et fréquent (49 %) d'augmentation du nombre de copies de l'*EGFR*. Les mutations du domaine tyrosine kinase de l'*EGFR* étaient rares.

La surexpression de MET était observée dans 17 % des cas, ce qui contrastait avec l'absence d'amplification génique de *MET*. Cette disparité pourrait être liée à des modulations transcriptionnelles ou de dégradation du récepteur, et reste à explorer. Seulement 3 % des tumeurs surexprimaient la protéine HER2

Enfin, contrairement à ce qui est observé dans les CCRs, les mutations de *KRAS* et *BRAF* étaient rares dans notre série.

Ces résultats suggèrent que l'EGFR et MET peuvent jouer un rôle dans l'oncogenèse des ITACs puisque ces récepteurs sont fréquemment exprimés. L'amplification de ces gènes ne semble pas être le principal mécanisme d'oncogenèse. D'autre part, aucun des marqueurs moléculaires étudiés n'avait de valeur pronostique.

Les critères clinico-pathologiques restent actuellement les meilleurs marqueurs prédictifs d'une évolution défavorable. Il s'agissait dans notre série d'un stade tumoral avancé, d'une exérèse incomplète et de la présence d'un contingent histologique mucineux ou solide (peu différencié).

Notre travail complète la littérature dans la justification d'éventuelles études pré-cliniques et cliniques qui elles seules pourront répondre à la question d'un bénéfice ou non d'une thérapie ciblée anti-EGFR chez les patients atteints d'ITACs. En effet dans ces tumeurs, comme nous l'avons signalé, l'EGFR est fréquemment exprimé et il semble exister peu d'altérations moléculaires habituellement reconnues comme facteur de résistance aux anticorps monoclonaux anti-EGFR.

Bibliographie

1. Khademi, B., Moradi, A., Hoseini, S. & Mohammadianpanah, M. Malignant neoplasms of the sinonasal tract: report of 71 patients and literature review and analysis. *Oral Maxillofac. Surg.* **13**, 191–199 (2009).
2. Turner, J. H. & Reh, D. D. Incidence and survival in patients with sinonasal cancer: a historical analysis of population-based data. *Head Neck* **34**, 877–885 (2012).
3. Barnes, L. *Pathology and genetics of head and neck tumours*. (IARC Press, 2005).
4. Choussy, O. *et al.* Adenocarcinoma of Ethmoid: a GETTEC retrospective multicenter study of 418 cases. *Laryngoscope* **118**, 437–443 (2008).
5. REFCOR. Recommandation pour la Pratique Clinique - Tumeurs malignes primitives des fosses nasales et des sinus. *ORL Fr.* (2009). at <<http://www.orlfrance.org>>
6. SFMT. Recommandations pour la surveillance médicoprofessionnelle des travailleurs exposés à l'effet cancérigène des poussières de bois. *Arch. Mal. Prof. Environ.* **72**, 119–172 (2011).
7. Heinemann, V., Stintzing, S., Kirchner, T., Boeck, S. & Jung, A. Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treat. Rev.* **35**, 262–271 (2009).
8. Synthèse d'avis de la commission de la transparence : Erbitux. at <<http://www.has-sante.fr>>
9. Netter, F. H. *Atlas d'anatomie humaine*. (Masson, 2004).
10. Netter, F. H. & Cochard, L. R. *Atlas d'embryologie humaine*. (Masson, 2003).
11. Langman, J. *Embryologie médicale*. (Masson, 1984).
12. Chomette, G. & Auriol, M. *Histopathologie buccale et cervico-faciale*. (Masson, 1986).
13. Legend, F., Perlemuter, L. & Vandenbrouk, C. *Cahiers d'anatomie ORL. Fosses nasales et pharynx*. (Masson, 1986).
14. Marsot-Dupuch, K. & Genty, E. Les variantes anatomiques des sinus de la face. *J Radiol* (2003).
15. Coffinet, L. *et al.* Explorations physiques et fonctionnelles des fosses nasales. *EMC-Oto-Rhino-Laryngol.* **1**, 2–21 (2004).
16. Eloy, P., Nolleaux, M.-C. & Bertrand, B. Physiologie des sinus paranasaux. *EMC - Oto-Rhino-Laryngol.* **2**, 185–197 (2005).
17. Grégoire, R. & Oberlin, S. *Précis d'anatomie*. (JB Baillière, 1981).
18. Sternberg, S. S. *Histology for pathologists*. (Lippincott-Raven Publishers, 1997).
19. Heath, J. W. *Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater*. (De Boeck, 2008).
20. De Gabory, L., Conso, F., Barry, B. & Stoll, D. La carcinogenèse de l'adénocarcinome de l'ethmoïde aux poussières de bois. *Rev. Laryngol. - Otol. - Rhinol.* **130**, 93–104 (2009).
21. Franchi, A., Miligi, L., Palomba, A., Giovannetti, L. & Santucci, M. Sinonasal carcinomas: recent advances in molecular and phenotypic characterization and their clinical implications. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **79**, 265–277 (2011).
22. Poizat, F. *et al.* Adénocarcinomes des fosses nasales et des sinus : pièges diagnostiques des lésions glandulaires naso-sinusiennes. *Ann. Pathol.* **29**, 286–295 (2009).
23. Rodriguez, J. Stratégie du dépistage des cancers O.R.L. dus aux poussières de bois. *Arch. Mal. Prof. Environ.*
24. Mills, S. E., Gaffey, M. J. *Tumors of the upper aerodigestive tract and ear*. (Armed Forces Institute of Pathology, 2000).
25. Cantu, G. *et al.* Intestinal type adenocarcinoma of the ethmoid sinus in wood and leather workers: a retrospective study of 153 cases. *Head Neck* **33**, 535–542 (2011).
26. Friberg, S. & Mattson, S. On the growth rates of human malignant tumors: implications for medical decision making. *J. Surg. Oncol.* **65**, 284–297 (1997).
27. Svane-Knudsen, V., Jørgensen, K. E., Hansen, O., Lindgren, A. & Marker, P. Cancer of the nasal cavity and paranasal sinuses: a series of 115 patients. *Rhinology* **36**, 12–14 (1998).
28. Ferrié, J. C., Martin-Duverneuil, N., Dufour, X. & Klossek, J. M. Place de l'imagerie dans le bilan préthérapeutique et la surveillance post-thérapeutique des tumeurs malignes du massif facial. *J. Radiol.* **89**, 984–997 (2008).

29. Maroldi, R. *et al.* MR of malignant nasosinusal neoplasms. Frequently asked questions. *Eur. J. Radiol.* **24**, 181–190 (1997).
30. Som, P. M., Lawson, W., Biller, H. F. & Lanzieri, C. F. Ethmoid sinus disease: CT evaluation in 400 cases. Part I. Nonsurgical patients. *Radiology* **159**, 591–597 (1986).
31. Lamoral, Y., Lemahieu, S. F. & Vrielinck, L. The role of CT in the diagnosis of adenocarcinoma of the ethmoid. *J. Belge Radiol.* **73**, 273–277 (1990).
32. Barnes, L. Intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Am. J. Surg. Pathol.* **10**, 192–202 (1986).
33. Kleinsasser, O. & Schroeder, H. G. Adenocarcinomas of the inner nose after exposure to wood dust. Morphological findings and relationships between histopathology and clinical behavior in 79 cases. *Arch. Otorhinolaryngol.* **245**, 1–15 (1988).
34. Klintonberg, C., Olofsson, J., Hellquist, H. & Sökjer, H. Adenocarcinoma of the ethmoid sinuses. A review of 28 cases with special reference to wood dust exposure. *Cancer* **54**, 482–488 (1984).
35. Gamez-Araujo, J. J., Ayala, A. G. & Guillamondegui, O. Mucinous adenocarcinomas of nose and paranasal sinuses. *Cancer* **36**, 1100–1105 (1975).
36. Franquemont, D. W., Fechner, R. E. & Mills, S. E. Histologic classification of sinonasal intestinal-type adenocarcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **15**, 368–375 (1991).
37. Franchi, A., Gallo, O. & Santucci, M. Clinical relevance of the histological classification of sinonasal intestinal-type adenocarcinomas. *Hum. Pathol.* **30**, 1140–1145 (1999).
38. Moll, R., Divo, M. & Langbein, L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem. Cell Biol.* **129**, 705–733 (2008).
39. Kennedy, M. T., Jordan, R. C. K., Berean, K. W. & Perez-Ordoñez, B. Expression pattern of CK7, CK20, CDX-2, and villin in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *J. Clin. Pathol.* **57**, 932–937 (2004).
40. Casiraghi, O. & Lefèvre, M. Tumeurs malignes indifférenciées à cellules rondes des cavités naso-sinusiennes et du nasopharynx. *Ann. Pathol.* **29**, 296–312 (2009).
41. Dilhuydy, J. M. *et al.* Ethmoidal cancers: a retrospective study of 22 cases. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **25**, 113–116 (1993).
42. International Union against Cancer. *TNM classification of malignant tumours*. (Wiley-Blackwell, 2009).
43. Moreau, J. J. *et al.* Adénocarcinomes de l'éthmoïde chez les travailleurs du bois : étude rétrospective de 25 cas. *Neurochirurgie* **43**, 111–117 (1997).
44. García-Inclán, C. *et al.* EGFR status and KRAS/BRAF mutations in intestinal-type sinonasal adenocarcinomas. *Cell. Oncol. Dordr.* **35**, 443–450 (2012).
45. López, F. *et al.* KRAS and BRAF mutations in sinonasal cancer. *Oral Oncol.* **48**, 692–697 (2012).
46. Stoll, D., Bébéar, J. P., Truilhé, Y., Darrouzet, V. & David, N. Les adénocarcinomes de l'éthmoïdes : étude rétrospective de 76 patients. *Rev. Laryngol. - Otol. - Rhinol.* **122**, 21–29 (2001).
47. Bhayani, M. K. *et al.* Sinonasal adenocarcinoma: A 16-year experience at a single institution. *Head Neck* (2013).
48. Alvarez, I., Suárez, C., Rodrigo, J. P., Nuñez, F. & Caminero, M. J. Prognostic factors in paranasal sinus cancer. *Am. J. Otolaryngol.* **16**, 109–114 (1995).
49. Jegoux, F. *et al.* Adénocarcinomes de l'éthmoïde : expérience nantaise (80 cas): Place de la résection de la base du crâne par voie trans-faciale. *Ann. Otolaryngol. Chir. Cervico-Faciale* **121**, 213–221 (2004).
50. IARC. Wood dust. *Monogr. Eval. Carcinog. Risks Humans World Heal. Organ. Int. Agency Res. Cancer* **62**, 35–215 (1995).
51. Vivanco, B. *et al.* Benign lesions in mucosa adjacent to intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *Pathol. Res. Int.* **2011**, 230147 (2011).
52. Holmila, R. *et al.* COX-2 and p53 in human sinonasal cancer: COX-2 expression is associated with adenocarcinoma histology and wood-dust exposure. *Int. J. Cancer* **122**, 2154–2159 (2008).
53. Choi, H. R. *et al.* Sinonasal adenocarcinoma: evidence for histogenetic divergence of the enteric and nonenteric phenotypes. *Hum. Pathol.* **34**, 1101–1107 (2003).

54. Piard, F. *et al.* Les voies de la carcinogénèse colorectale: intérêt et application pour le pathologiste. *Ann. Pathol.* **22**, 277–288 (2002).
55. Remvikos, Y. *et al.* DNA-repeat instability is associated with colorectal cancers presenting minimal chromosome rearrangements. *Genes. Chromosomes Cancer* **12**, 272–276 (1995).
56. Ciardiello, F. & Tortora, G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1160–1174 (2008).
57. Guillaudeau, A. *et al.* Adult diffuse gliomas produce mRNA transcripts encoding EGFR isoforms lacking a tyrosine kinase domain. *Int. J. Oncol.* **40**, 1142–1152 (2012).
58. Basu, A., Raghunath, M., Bishayee, S. & Das, M. Inhibition of tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor (EGF) receptor by a truncated receptor form that binds to EGF: role for interreceptor interaction in kinase regulation. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 671–677 (1989).
59. Halle, C. *et al.* Membranous expression of ectodomain isoforms of the epidermal growth factor receptor predicts outcome after chemoradiotherapy of lymph node-negative cervical cancer. *Clin. Cancer Res.* **17**, 5501–5512 (2011).
60. Goldstein, N. S. & Armin, M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer* **92**, 1331–1346 (2001).
61. Yen, L.-C. *et al.* Activating KRAS mutations and overexpression of epidermal growth factor receptor as independent predictors in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *Ann. Surg.* **251**, 254–260 (2010).
62. Shia, J. *et al.* Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Mod. Pathol.* **18**, 1350–1356 (2005).
63. Custodio, A. & Feliu, J. Prognostic and predictive biomarkers for epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer: Beyond KRAS mutations. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **85**, 45–81 (2013).
64. Yang, Z.-Y. *et al.* EGFR gene copy number as a predictive biomarker for the treatment of metastatic colorectal cancer with anti-EGFR monoclonal antibodies: a meta-analysis. *J. Hematol. Oncol.* **5**, 52 (2012).
65. Franchi, A. *et al.* Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in sinonasal intestinal type adenocarcinoma. *Oral Oncol.* **45**, 835–838 (2009).
66. Szablewski, V. *et al.* EGFR Expression and KRAS and BRAF Mutational Status in Intestinal-Type Sinonasal Adenocarcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 5170–5181 (2013).
67. Maramotti, S. *et al.* Soluble epidermal growth factor receptor isoforms in non-small cell lung cancer tissue and in blood. *Lung Cancer Amst. Neth.* **76**, 332–338 (2012).
68. Guillaudeau, A. *et al.* EGFR soluble isoforms and their transcripts are expressed in meningiomas. *PLoS One* **7**, e37204 (2012).
69. Sartore-Bianchi, A. *et al.* Standardisation of EGFR FISH in colorectal cancer: results of an international interlaboratory reproducibility ring study. *J. Clin. Pathol.* **65**, 218–223 (2012).
70. Personeni, N. *et al.* Clinical usefulness of EGFR gene copy number as a predictive marker in colorectal cancer patients treated with cetuximab: a fluorescent in situ hybridization study. *Clin. Cancer Res.* **14**, 5869–5876 (2008).
71. Sartore-Bianchi, A. *et al.* Epidermal Growth Factor Receptor Gene Copy Number and Clinical Outcome of Metastatic Colorectal Cancer Treated With Panitumumab. *J. Clin. Oncol.* **25**, 3238–3245 (2007).
72. Porschen, R., Classen, S., Kahle, Y. & Borchard, F. In situ evaluation of the relationship between epidermal-growth-factor-receptor status and tumor-cell proliferation in colon carcinomas. *Int. J. Cancer* **54**, 189–193 (1993).
73. Buffet, W., Geboes, K. P., Dehertogh, G. & Geboes, K. EGFR-immunohistochemistry in colorectal cancer and non-small cell lung cancer: comparison of 3 commercially available EGFR-antibodies. *Acta Gastro-Enterol. Belg.* **71**, 213–218 (2008).
74. Moscatello, D. K. *et al.* Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res.* **55**, 5536–5539 (1995).
75. Spindler, K.-L. G. *et al.* Lack of the type III epidermal growth factor receptor mutation in colorectal cancer. *Anticancer Res.* **26**, 4889–4893 (2006).

76. Kosaka, T. *et al.* Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res.* **64**, 8919–8923 (2004).
77. Shigematsu, H. & Gazdar, A. F. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int. J. Cancer* **118**, 257–262 (2006).
78. Metzger, B. *et al.* The human epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in European patients with advanced colorectal cancer harbors infrequent mutations in its tyrosine kinase domain. *BMC Med. Genet.* **12**, 144 (2011).
79. Zlobec, I., Bihl, M. P., Schwarb, H., Terracciano, L. & Lugli, A. Clinicopathological and protein characterization of BRAF- and K-RAS-mutated colorectal cancer and implications for prognosis. *Int. J. Cancer* **127**, 367–380 (2010).
80. Milano, G. *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) status and K-Ras mutations in colorectal cancer. *Ann. Oncol.* **19**, 2033–2038 (2008).
81. Bornholdt, J. *et al.* K-ras mutations in sinonasal cancers in relation to wood dust exposure. *BMC Cancer* **8**, 53 (2008).
82. Barault, L. *et al.* Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *Int. J. Cancer* **122**, 2255–2259 (2008).
83. Russo, A. *et al.* The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J. Clin. Oncol.* **23**, 7518–7528 (2005).
84. Holmila, R. *et al.* Profile of TP53 gene mutations in sinonasal cancer. *Mutat. Res.* **686**, 9–14 (2010).
85. Perrone, F. *et al.* TP53, p14ARF, p16INK4a and H-ras gene molecular analysis in intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Int. J. Cancer* **105**, 196–203 (2003).
86. Holmila, R. *et al.* Mutations in TP53 tumor suppressor gene in wood dust-related sinonasal cancer. *Int. J. Cancer* **127**, 578–588 (2010).
87. Valente, G. *et al.* Evidence of p53 immunohistochemical overexpression in ethmoidal mucosa of woodworkers. *Cancer Detect. Prev.* **28**, 99–106 (2004).
88. Yom, S. S. *et al.* Genetic analysis of sinonasal adenocarcinoma phenotypes: distinct alterations of histogenetic significance. *Mod. Pathol.* **18**, 315–319 (2005).
89. Frattini, M. *et al.* Phenotype-genotype correlation: challenge of intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Head Neck* **28**, 909–915 (2006).
90. Takayama, T., Miyanishi, K., Hayashi, T., Sato, Y. & Niitsu, Y. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J. Gastroenterol.* **41**, 185–192 (2006).
91. Yim, K.-L. Microsatellite instability in metastatic colorectal cancer: a review of pathology, response to chemotherapy and clinical outcome. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **29**, 1796–1801 (2012).
92. Martínez, J. G. *et al.* Microsatellite instability analysis of sinonasal carcinomas. *Otolaryngol.--Head Neck Surg.* **140**, 55–60 (2009).
93. Köhne, C.-H. & Lenz, H.-J. Chemotherapy with targeted agents for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Oncologist* **14**, 478–488 (2009).
94. Karapetis, C. S. *et al.* K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1757–1765 (2008).
95. Di Nicolantonio, F. *et al.* Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5705–5712 (2008).
96. De Roock, W. *et al.* Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* **11**, 753–762 (2010).
97. Bardelli, A. *et al.* Amplification of the MET Receptor Drives Resistance to Anti-EGFR Therapies in Colorectal Cancer. *Cancer Discov.* **3**, 658–673 (2013).
98. Yonesaka, K. *et al.* Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Sci. Transl. Med.* **3**, 99ra86 (2011).
99. Bertotti, A. *et al.* A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts ('xenopatients') identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer. *Cancer Discov.* **1**, 508–523 (2011).

100. Sadiq, A. A. & Salgia, R. MET as a possible target for non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **31**, 1089–1096 (2013).
101. Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E. & Vande Woude, G. F. Met, metastasis, motility and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 915–925 (2003).
102. Tanizaki, J., Okamoto, I., Sakai, K. & Nakagawa, K. Differential roles of trans-phosphorylated EGFR, HER2, HER3, and RET as heterodimerisation partners of MET in lung cancer with MET amplification. *Br. J. Cancer* **105**, 807–813 (2011).
103. Jo, M. *et al.* Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 8806–8811 (2000).
104. Puri, N. & Salgia, R. Synergism of EGFR and c-Met pathways, cross-talk and inhibition, in non-small cell lung cancer. *J. Carcinog.* **7**, 9 (2008).
105. Breindel, J. L. *et al.* EGF Receptor activates MET through MAP kinases to enhance non-small cell lung carcinoma invasion and brain metastasis. *Cancer Res.* (2013).
106. Di Renzo, M. F. *et al.* Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **1**, 147–154 (1995).
107. Cappuzzo, F. *et al.* Primary resistance to cetuximab therapy in EGFR FISH-positive colorectal cancer patients. *Br. J. Cancer* **99**, 83–89 (2008).
108. Blok, E. J., Kuppen, P. J., van Leeuwen, J. E. & Sier, C. F. Cytoplasmic Overexpression of HER2: a Key Factor in Colorectal Cancer. *Clin. Med. Insights Oncol.* **7**, 41–51 (2013).
109. Ciardiello, F. & Normanno, N. HER2 signaling and resistance to the anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab: a further step toward personalized medicine for patients with colorectal cancer. *Cancer Discov.* **1**, 472–474 (2011).
110. Gallo, O. *et al.* Prognostic significance of c-erbB-2 oncoprotein expression in intestinal-type adenocarcinoma of the sinonasal tract. *Head Neck* **20**, 224–231 (1998).
111. Vivanco Allende, B. *et al.* Intestinal-type sinonasal adenocarcinomas. Immunohistochemical profile of 66 cases. *Acta Otorrinolaringológica Española* **64**, 115–123 (2013).
112. Nazar, G. *et al.* Amplification of CCND1, EMS1, PIK3CA, and ERBB oncogenes in ethmoid sinus adenocarcinomas. *Otolaryngol.-Head Neck Surg.* **135**, 135–139 (2006).
113. Shankaran, H., Zhang, Y., Tan, Y. & Resat, H. Model-Based Analysis of HER Activation in Cells Co-Expressing EGFR, HER2 and HER3. *PLoS Comput. Biol.* **9**, e1003201 (2013).
114. Progetti, F. *et al.* Epidermal growth factor receptor expression and KRAS and BRAF mutations: study of 39 sinonasal intestinal-type adenocarcinomas. *Hum. Pathol.* (2013).
115. Polosa, R. *et al.* Expression of c-erbB receptors and ligands in human nasal epithelium. *J. Allergy Clin. Immunol.* **106**, 1124–1131 (2000).
116. Varella-Garcia, M. *et al.* EGFR fluorescence in situ hybridisation assay: guidelines for application to non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Pathol.* **62**, 970–977 (2009).
117. BLAST. at <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>
118. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
119. Hsieh, A. C. & Moasser, M. M. Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target HER3. *Br. J. Cancer* **97**, 453–457 (2007).
120. Roepstorff, K. *et al.* Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic Cph. Den.* **10**, 1115–1127 (2009).
121. Sesboué, R., Le Pessot, F., Di Fiore, F. & Frebourg, T. EGFR alterations and response to anti-EGFR therapy: is it a matter of gene amplification or gene copy number gain? *Br. J. Cancer* **106**, 426–427; author reply 428 (2012).
122. Pérez-Escuredo, J. *et al.* Establishment and genetic characterization of an immortal tumor cell line derived from intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *Cell. Oncol. Dordr.* **34**, 23–31 (2011).
123. Baisse, B., Bouzourene, H., Saraga, E. P., Bosman, F. T. & Benhattar, J. Intratumor genetic heterogeneity in advanced human colorectal adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* **93**, 346–352 (2001).
124. Gerlinger, M. *et al.* Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* **366**, 883–892 (2012).
125. Spigel, D., Ervin, T. J. & Ramlau, R. Final efficacy results from OAM4558g, a randomized phase II study evaluating MetMab or placebo in combination with erlotinib in advanced NSCLC. (2011). at <<http://www.asco.org>>

126. Bendell, J. C. *et al.* Treatment Rationale and Study Design for a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase II Study Evaluating Onartuzumab (MetMab) in Combination With Bevacizumab Plus mFOLFOX-6 in Patients With Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer. *Clin. Colorectal Cancer* (2013).
127. Dziadziuszko, R. *et al.* Correlation between MET gene copy number by silver in situ hybridization and protein expression by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **7**, 340–347 (2012).
128. Rüschoff, J. *et al.* HER2 testing in gastric cancer: a practical approach. *Mod. Pathol.* **25**, 637–650 (2012).
129. Rho, H. S. *et al.* Overexpression of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in nasal polyps. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **132**, 985–989 (2006).
130. Go, H. *et al.* High MET gene copy number leads to shorter survival in patients with non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **5**, 305–313 (2010).
131. Cappuzzo, F. *et al.* Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1667–1674 (2009).
132. Lee, H. E. *et al.* MET in gastric carcinomas: comparison between protein expression and gene copy number and impact on clinical outcome. *Br. J. Cancer* **107**, 325–333 (2012).
133. Lennerz, J. K. *et al.* MET amplification identifies a small and aggressive subgroup of esophagogastric adenocarcinoma with evidence of responsiveness to crizotinib. *J. Clin. Oncol.* **29**, 4803–4810 (2011).
134. Carracedo, A. *et al.* FISH and immunohistochemical status of the hepatocyte growth factor receptor (c-Met) in 184 invasive breast tumors. *Breast Cancer Res.* **11**, 402 (2009).
135. Janjigian, Y. Y. *et al.* MET expression and amplification in patients with localized gastric cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **20**, 1021–1027 (2011).
136. Ivan, M., Bond, J. A., Prat, M., Comoglio, P. M. & Wynford-Thomas, D. Activated ras and ret oncogenes induce over-expression of c-met (hepatocyte growth factor receptor) in human thyroid epithelial cells. *Oncogene* **14**, 2417–2423 (1997).
137. Wolff, A. C. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **25**, 118–145 (2007).
138. De Oliveira, A. T. T. *et al.* MET Is highly expressed in advanced stages of colorectal cancer and indicates worse prognosis and mortality. *Anticancer Res.* **29**, 4807–4811 (2009).
139. Inno, A. *et al.* Is there a role for IGF1R and c-MET pathways in resistance to cetuximab in metastatic colorectal cancer? *Clin. Colorectal Cancer* **10**, 325–332 (2011).
140. Kruszewski, W. J. *et al.* Expression of HER2 in colorectal cancer does not correlate with prognosis. *Dis. Markers* **29**, 207–212 (2010).
141. Cabibi, D. *et al.* Differing expression of metalloprotease and of adhesion molecules in signet-ring cell and intestinal colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* **29**, 4417–4422 (2009).
142. Franchi, A. *et al.* Immunohistochemical investigation of tumorigenic pathways in sinonasal intestinal-type adenocarcinoma. A tissue microarray analysis of 62 cases. *Histopathology* **59**, 98–105 (2011).
143. Llorente, J. L., Pérez-Escuredo, J., Alvarez-Marcos, C., Suárez, C. & Hermsen, M. Genetic and clinical aspects of wood dust related intestinal-type sinonasal adenocarcinoma: a review. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **266**, 1–7 (2008).
144. Korinith, D. *et al.* Chromosomal imbalances in wood dust-related adenocarcinomas of the inner nose and their associations with pathological parameters. *J. Pathol.* **207**, 207–215 (2005).
145. Arnold, A. *et al.* Therapy options and long-term results of sinonasal malignancies. *Oral Oncol.* **48**, 1031–1037 (2012).
146. Vergez, S. *et al.* Endoscopic vs transfacial resection of sinonasal adenocarcinomas. *Otolaryngol.-Head Neck Surg.* **146**, 848–853 (2012).

Figures et tableaux

Figure 1. Vue frontale d'un embryon lors de la quatrième semaine de développement, adapté de Langman ¹¹	14
Figure 2. Coupe sagittale schématisée passant par la fosse nasale primitive chez un embryon de six semaines, adapté de Langman ¹¹	14
Figure 3. Paroi médiale des fosses nasales (septum nasal), adapté de Netter ⁹	15
Figure 4. Coupe frontale des fosses nasales, adapté de Netter ⁹	16
Figure 5. Epithélium respiratoire pseudo-stratifié, cylindrique cilié [hématoxyline-éosine-safran (HES) ; Laboratoire de Pathologie, Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Limoges].....	21
Figure 6. Coupe histologique d'un cornet (HES ; Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).	21
Figure 7. IRM du massif facial (séquence T2, coupe coronale ; Service de Radiologie, CHU de Limoges) d'une volumineuse tumeur ethmoïdo-nasale gauche (#) arrivant au contact du plancher des fosses nasales et de la lame criblée (sans extension endocrânienne), franchissant la ligne septale médiane au-dessus du plan des cornets moyen avec envahissement de l'ethmoïde droit, et respectant les orbites. A noter un aspect rétentif du sinus maxillaire gauche (*).	29
Figure 8. Aspect macroscopique d'un ITAC (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).....	31
Figure 9. Aspects morphologiques similaires d'un CCR moyennement différencié (A#) et d'un ITAC de sous-type colique (B#). A noter les muqueuses non tumorales colique (A*) et respiratoire (B*), (HES x100 ; Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).....	31
Figure 10. Immunophénotypes similaires de l'épithélium colique normal [CK20+ (A*) / CK7- (B*)], d'un CCR [CK20+ (A#), CK7- (B#)] et d'un ITAC [CK20+ (C#), CK7- (D#)], contrairement à l'épithélium respiratoire [CK20- (C*), CK7+ (D*)], (IHC x50 ; Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).....	34
Figure 11. Exemples de diagnostics différentiels histologiques des ITACs : adénocarcinome naso-sinusal de type non-intestinal [A ; hématoxyline-phloxine-safran (HPS) x200 ; Laboratoire de Pathologie, CHU de la Timone, Marseille], tumeurs des glandes salivaires (B : carcinome adénoïde kystique ; C : carcinome muco-épidermoïde ; HES x200 ; Laboratoire de Pathologie, CHU Toulouse Rangueil), carcinome adéno-squameux (D), contingent adénocarcinomateux d'un neuroblastome olfactif (E), hamartome épithélial respiratoire adénomateux (F) et papillome schneidérien inversé (G), (D, E, F et G ; HES x100 ; Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).	38
Figure 12. Hypothèses physiopathologiques de la tumorigenèse des ITACs selon Kennedy et al ³⁹	43
Figure 13. Exemple de lésions de métaplasie intestinale de l'épithélium respiratoire chez un patient atteint d'un ITAC. Ces lésions correspondent à une transformation de l'épithélium respiratoire en un épithélium de type intestinal avec notamment augmentation du nombre des cellules caliciformes (A ; HES x400) et acquisition d'un immunophénotype de type intestinal [CK7- (B), CK20+ (C) et CDX-2+ (D)], (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).....	43
Figure 14. Voies de signalisation de l'EGFR, adapté de Ciardiello et al ⁵⁶	46
Figure 15. Sous-types histologiques de la série selon Barnes ³² : papillaire (A), colique (B), mucineux à cellules en bague à chaton (C) et mixte [colique (D*) et mucineux de type alvéolaire (D#)], (HES, Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).	63
Figure 16. Superposition d'un foyer tumoral présentant une amplification génique de l' <i>EGFR</i> (A, FISH x400, Laboratoire de Cytogénétique, CHU de Limoges) et une surexpression protéique de l' <i>EGFR</i> _{DIC} (B, IHC x400, Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).	67
Figure 17. Exemples d'analyses par PCR HRM et séquençage [Plateforme d'oncologie moléculaire (POM), CHU de Limoges] : A, profil variant d'un échantillon tumoral sur la courbe de fusion analysée après PCR HRM ; B, présentation des mutations de <i>KRAS</i> et de <i>BRAF</i> de la série, interprétées après séquençage.....	67
Figure 18. Exemples d'analyses par RT-qPCR (POM, CHU Limoges) : A, gamme de référence de GAPDH ; B, courbe quantitative de l' <i>EGFRv1</i> d'un ITAC.....	68
Figure 19. ITAC de sous-type mixte avec contingent colique (A) et solide (B), (HES x200, Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).	77

Figure 20. Etude en IHC avec les anticorps anti-EGFR _{DEC} [1+ (A), 2+ (B), 3+ (C)] et anti-EGFR _{DIC} [1+ (D), 2+ (E), 3+ (F)] ; synthèse des résultats sur les 191 spots interprétables de TMA (G). La surexpression (3+) de l'EGFR _{DEC} était fortement associée à celle de l'EGFR _{DIC} ($P < 0,0001$).	81
Figure 21. Etude en IHC avec les anticorps anti-MET [1+ (A), 2+ (B), 3+ (C)] et anti-EGFR _{DEC} ; synthèse des résultats sur les 188 spots interprétables de TMA (D).	82
Figure 22. Etude en IHC d'HER2 [1+ (A), 2+ (B), 3+ (C)] et de l'EGFR _{DEC} ; synthèse des résultats sur les 191 spots interprétables de TMA (G).	82
Figure 23. Etude du nombre de copies de l' <i>EGFR</i> en FISH [amplification génique (A), polysomie CEN7 (B) et absence de gain (C)] ; synthèse des résultats comparativement à l'étude en IHC de l'EGFR _{DEC} (D) et de l'EGFR _{DIC} (E), respectivement sur les 155 et 147 spots interprétables de TMA. L'amplification de l' <i>EGFR</i> était fortement associée à la surexpression protéique de l'EGFR _{DEC} et de l'EGFR _{DIC} ($P < 0,0001$).	84
Figure 24. Etude du nombre de copies de <i>MET</i> en DISH [polysomie CEN7 (A) et absence de gain (B)] ; synthèse des résultats comparativement à l'étude en IHC de MET, sur les 150 spots interprétables de TMA (C).	85
Figure 25. Probabilité de survie globale (A et B) et de survie sans progression (C et D) selon le stade tumoral d'après la classification TNM 2009 de l'UICC (A et C) et la présence ou non d'un contingent histologique mucineux ou solide (B et D).	87

Tableau 1. Classification des sous-types histologiques des ITACs selon les classifications de Barnes ³² et Kleinsasser ³³	30
Tableau 2. Classification TNM 2009 de l'UICC des carcinomes naso-sinusiens ⁴²	39
Tableau 3. Caractéristiques des anticorps anti-EGFR utilisés en immunohistochimie.	53
Tableau 4. Amorces <i>KRAS</i> et <i>BRAF</i> utilisées pour la PCR et le séquençage.	58
Tableau 5. Amorces utilisées pour la RT-qPCR.	61
Tableau 6. Données cliniques et histopathologiques des 39 patients.	62
Tableau 7. Expression protéique de l'EGFR en IHC selon la plus forte intensité de marquage de chaque tumeur de la série de 39 cas.	64
Tableau 8. Relation entre les analyses de l'EGFR en FISH et en IHC de la série de 39 cas.	65
Tableau 9. Données cliniques et histopathologiques des 111 patients.	78
Tableau 10. Expression protéique en IHC de l'EGFR _{DEC} , l'EGFR _{DIC} , MET et d'HER2 selon la plus forte intensité de marquage de chaque tumeur de la série complémentaire des 72 cas.	78
Tableau 11. Résultats de l'analyse de l' <i>EGFR</i> et de <i>MET</i> par HIS selon le plus fort score de chaque tumeur de la série complémentaire des 72 cas.	83



ELSEVIER

Original contribution

Epidermal growth factor receptor expression and *KRAS* and *BRAF* mutations: study of 39 sinonasal intestinal-type adenocarcinomas

Fabrice Progetti MD^a, Karine Durand PhD^a, Alain Chaunavel PhD^a,
Sophie Léobon MPH^b, Sylvain Lacorre BS^a, François Caire MD^c,
Jean-Pierre Bessède MD^d, Jean-Jacques Moreau MD^c, Béma Coulibaly MD, PhD^{a,1},
François Labrousse MD^{a,*}

^aDepartment of Pathology, Dupuytren University Hospital, 2 Avenue Martin Luther King, 87042 Limoges, France

^bMedical Oncology, Dupuytren University Hospital, 87042 Limoges, France

^cNeurosurgery, Dupuytren University Hospital, 87042 Limoges, France

^dHead and Neck Surgery, Dupuytren University Hospital, 87042 Limoges, France

Received 25 January 2013; revised 27 February 2013; accepted 16 March 2013

Keywords:

EGFR;
EGFR amplification;
EGFR copy number gain;
EGFR
immunohistochemistry;
Sinonasal intestinal-type
adenocarcinoma

Summary Sinonasal intestinal-type adenocarcinomas (ITACs) are uncommon tumors of poor prognosis defined by their similarities to colorectal adenocarcinomas. The involvement of the epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway in colorectal adenocarcinoma oncogenesis is well established, and the same is expected to apply to ITACs. In a series of 39 ITACs, we investigated *EGFR* amplification and chromosome 7 polysomy by fluorescence in situ hybridization; *EGFR*, *KRAS*, and *BRAF* mutational status by polymerase chain reaction sequencing; *EGFR* variant messenger RNA expression by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction; and EGFR protein expression by immunohistochemistry with antibodies targeting the extracellular domain, the intracellular domain, and the phosphorylated isoform. The findings were analyzed with respect to clinical data, histologic typing, and patient outcome. *EGFR* amplification was observed in 3 cases with a focal distribution. EGFR proteins were overexpressed in all these foci with both extracellular domain and intracellular domain antibodies, suggesting involvement of the whole receptor. Chromosome 7 polysomy was observed in 15 cases and was not associated with EGFR protein expression. *EGFR*, *KRAS*, or *BRAF* mutations were observed in 5 different cases. The EGFRvIII mutant was not detected. In all cases, EGFR variants were expressed. There was no association between these molecular features and patient survival. In conclusion, (1) our study revealed various EGFR expression patterns in ITACs, indicating tumor heterogeneity; (2) *EGFR* amplification should be distinguished from chromosome 7 polysomy; (3) fluorescence in situ hybridization analysis could be guided by immunohistochemistry; and (4) ITACs share common alterations of the EGFR pathway with colorectal adenocarcinomas, except for a lower frequency of *KRAS* and *BRAF* mutations.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail address: labrousse@unilim.fr (F. Labrousse).

¹ Both authors contributed equally to this work.

1. Introduction

About 12% of all the malignant tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses are primary sinonasal adenocarcinomas [1]. The World Health Organization (WHO) classification recognizes 2 categories, intestinal-type adenocarcinomas (ITACs) and non-intestinal-type adenocarcinomas [2]. ITACs constitute 80% of cases [3] and are defined according to their morphologic and immunohistochemical (IHC) similarities with colorectal adenocarcinomas [2,4]. The treatment of ITAC is usually surgery, frequently associated with radiotherapy and sometimes with neoadjuvant chemotherapy [5]. Despite therapeutic progress, the prognosis of ITAC remains poor, with local recurrence in about 50% of the cases and a 5-year cumulative survival rate of around 40% [2].

The epidermal growth factor receptor (EGFR) and its signaling pathway have been implicated in various cancers. In colorectal adenocarcinomas, EGFR overexpression (protein or messenger RNA [mRNA]), *EGFR* gene copy number gain (*EGFR*-CNG) by amplification or polysomy, and *KRAS* (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) or *BRAF* (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) mutations are prognostic and predictive factors, particularly for the response to anti-EGFR therapies [6-8]. Mutations of the intracellular tyrosine kinase domain (exons 18-21) of *EGFR* are frequent in lung adenocarcinomas [9] but uncommon in colorectal adenocarcinomas [10]. The EGFR variant III (vIII), a constitutively active mutant, has been found in glioblastomas and in breast and ovarian carcinomas [11] but never reported in colorectal cancers [12].

The *EGFR* gene generates different mRNAs by alternative splicing. The mRNA variant 1 (v1) encodes the full-length receptor, referred to as EGFR or human epidermal receptor 1 (HER1), which is the most widely documented in the literature. Additional variants, mRNAs 2, 3, and 4 (v2, v3, and v4), encode the soluble EGFR isoforms b, c, and d, respectively. These isoforms have a complete or truncated extracellular domain (ECD) but lack the intracellular domain (ICD) and, consequently, cannot directly activate the downstream signaling pathway. The expression of EGFR variants v2 to v4 has been reported in various tumors including infiltrative gliomas, meningiomas, and lung adenocarcinomas [13-15].

IHC findings for the EGFR proteins vary according to tumor type and the antibody (Ab) used. For example, protein expression in colorectal adenocarcinomas has been reported to be strong, moderate, or weak [16]; also, staining intensity and numbers of positive cells are higher in glioblastomas than in meningiomas [14,17]. Because different EGFR isoforms can be present, the IHC results may vary depending on whether the Ab used recognizes the ECD or the ICD. Few studies have analyzed the expression of the phosphorylated form of EGFR (pEGFR) [18].

In intestinal-type adenocarcinomas, the EGFR signaling pathway has been investigated in some series [19-22], and *EGFR*-CNG, rare *KRAS* mutations, and EGFR protein overexpression were reported. To our knowledge, there is no

information currently available about soluble EGFR isoform and mutant EGFRvIII expression in these tumors. Furthermore, all published IHC analyses used antibodies targeted against the ECD of the receptor [20,21].

We therefore aimed to clarify the involvement, if any, of the EGFR signaling pathway in ITAC oncogenesis and to identify morphologic or molecular markers with possible prognostic value. Accordingly, we sought *EGFR* amplification and chromosome 7 polysomy; investigated the *EGFR*, *KRAS*, and *BRAF* mutational status; evaluated mRNAs for whole and soluble EGFR forms; and performed IHC with antibodies directed against EGFR-ECD, EGFR-ICD, and pEGFR. The results were analyzed with respect to clinical data, histologic typing data, progression-free survival (PFS), and overall survival (OS).

2. Materials and methods

2.1. Patients and tissue samples

We studied 39 surgical tissue samples from patients with ITAC, treated between 1996 and 2011 at Limoges Dupuytren University Hospital. Tumors were classified according to the WHO classification of sinonasal adenocarcinomas [2]. Clinical, occupational exposure, therapeutic, and survival data were obtained retrospectively. At the time of resection, 35 tumor samples were fixed in 4% formalin and 4 samples in Bouin liquid (picric acid, acetic acid, formaldehyde). All samples were embedded in paraffin, and sections were stained with hematoxylin-eosin-saffron. In all cases, a part of the surgical specimen was snap frozen in liquid nitrogen and stored at -140°C . Before analyses, all the frozen samples were assessed histologically to evaluate the percentage of tumor cells. This study was performed in accordance with French bioethics laws regarding patient information and consent.

2.2. EGFR protein analysis by IHC

Five- μm -thick paraffin sections were obtained from paraffin-embedded blocks. Three different anti-EGFR antibodies were tested (Table 1), which recognized the EGFR ECD (ECD-Ab), ICD (ICD-Ab), and phosphorylated tyrosine 1068 (pEGFR-Ab). Slides were processed automatically (BenchMark XT ICH/ISH; Ventana Medical Systems, Illkirsh, France) according to the protocols supplied by the Ab manufacturers. Isotype controls were performed for each Ab. For ECD-Ab and ICD-Ab, the basal layer of the respiratory mucosa served as a positive control [23]. EGFR staining was scored as the following [20,24]: negative (0); weak (1+) reactivity that was membranous, cytoplasmic, or both; moderate (2+) membranous reactivity and frequent cytoplasmic reactivity that was of weaker intensity than the membrane reactivity; and strong (3+) membranous reactivity, usually associated with cytoplasmic staining of weaker

Table 1 Characteristics of EGFR antibodies used for IHC

Clone	Domain targeted	EGFR isoform targeted	Dilution	Manufacturer
3C6	Extracellular	a, b, c, d, vIII	Pure	Ventana
EGFR.25	Intracellular	a, vIII	1:50	Novocastra, Nanterre, France
Polyclonal	P-Tyr1068	a, b, c, d, vIII	1:500	Ozyme

intensity. Strong staining (3+) was considered as overexpression. For statistical analysis, tumors were classified according to their highest staining score. All cases were studied with ECD-Ab and ICD-Ab. Only tumors positive for ECD-Ab and/or ICD-Ab were subjected to IHC with pEGFR-Ab.

2.3. EGFR gene copy number analysis by fluorescence in situ hybridization

Fluorescence in situ hybridization (FISH) was performed on paraffin sections (adjacent to the sections used for IHC), with Zytolight SPEC *EGFR*/centromere 7 (CEN7) Dual Color Probes (Zytovision, Clinisciences, Nanterre, France) according to the manufacturer's protocol. The tumor areas exhibiting the strongest staining with ECD-Ab and/or ICD-Ab were used for FISH. The FISH protocol, microscopic observation, and data acquisition were as previously described [15]. Signals were scored in at least 150 interphase nuclei in 5 different tumor areas. Overlapping and disrupted nuclei were not considered. We determined *EGFR*-CNG caused by gene amplification or polysomy. Patients were classified into 3 groups. (1) *EGFR* gene amplification according to 1 of the following criteria: *EGFR*/CEN7 2 or greater, gene cluster, or at least 15 copies of *EGFR* in at least 10% of cells [25]; (2) chromosome 7 polysomy (≥ 3 CEN7 copies in $>30\%$ of cells) [20,21]; and (3) no *EGFR*-CNG: samples without gene amplification or polysomy.

2.4. Extraction of genomic DNA

Tumor genomic DNA (gDNA) was extracted from 10 mg samples of dewaxed paraffin tissue, using a QiaAmp DNA microkit (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's recommendations. Samples were treated with RNase to prevent RNA contamination, and the purified gDNA was eluted in distilled water. The concentration and purity of gDNA were estimated by spectrophotometry (NanoDrop1000; Labtech, Palaiseau, France).

2.5. Analysis of mutations in *EGFR*, *KRAS*, and *BRAF*

The presence of mutations in *EGFR* exons 18 (p.G719X), 19 (deletion ELREA or other), 20 (insertion at the codon S768 and p.T790M), and 21 (p.L858R and p.L861Q) was determined by pyrosequencing. Briefly, 10 ng of gDNA was amplified with biotinylated primers supplied in the Therascreen EGFR Pyro kit (Qiagen) following the manufac-

turer's instructions. Pyrosequencing was performed in the PyroMark Q24 System (Qiagen).

The mutation status of *KRAS* exon 2 and *BRAF* exon 15 was analyzed by high-resolution melting (HRM) in a 7500 FAST thermocycler (Life Technologies, Saint-Aubin, France). For this, 20 ng of gDNA was amplified with the Melt Doctor HRM Master Mix kit (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol in the presence of 0.2 μ M of primers (Table 2). Enzymatic activation was at 95°C for 15 minutes, and amplification involved 40 (*KRAS*) or 50 (*BRAF*) cycles (15 seconds at 96°C, 20 seconds at 56°C [*KRAS*] or 60°C [*BRAF*], 20 seconds at 72°C). At the end of amplification, a melt curve was obtained by increasing the temperature of the sample by 0.1°C/s. Melt curves were analyzed with high-resolution melting v2.0.1 software (Life Technologies). Samples with a melting profile different from that of the wild-type control were purified with NucleoSpin Gel and polymerase chain reaction (PCR) Clean-up kits (Macherey Nagel, Hoerd, France), and their sequences were determined. The forward primer and the Big Dye Terminator V1.1 kit (Life Technologies), according to the manufacturer's protocol, purification with a DyeEx 2.0 Spin kit (Qiagen), and a Genetic Analyzer 3130XL (Life Technologies) were used. Four tumors were excluded from analysis because they had been fixed in Bouin liquid, and one because the tumor cell density was lower than 20%.

2.6. RNA extraction

After the histologic analysis of the frozen samples, 11 cases were excluded from this analysis because of a tumor cell density less than 20% caused by necrosis and/or intense inflammatory reaction. Ten to 30 mg of frozen tumor tissue was pulverized twice for 40 seconds at 6500 rpm in the presence of CK14 ceramic beads in a Precellys 24 homogenizer (Ozyme,

Table 2 Oligonucleotides used for PCR amplification and sequencing

Oligonucleotide	Sequence 5' to 3'
<i>KRAS</i> exon 2 forward	TTATAAGGCCTGCTGAAAATG
<i>KRAS</i> exon 2 reverse	CAAGATTTACCTCTATTGTTGGATCA
<i>BRAF</i> exon 15 forward	TGTTTTTCCTTACTTACTACACCTCAGA
<i>BRAF</i> exon 15 reverse	TGTCTGGATCCATTTGTGG

Saint Quentin Yvelines, France) with 600 μ L RLT lysis buffer (Qiagen; RNeasy mini kit) and 6 μ L 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). RNeasy tissue kits (Qiagen) were used according to the manufacturer's protocol to purify the RNA. A DNase I digestion step was included in each extraction to prevent contamination by gDNA. RNA concentration and purity were estimated by spectrophotometry (NanoDrop ND1000; Labtech). RNA quality was assessed by capillary electrophoresis (Bioanalyzer 2100; Agilent Technologies, Massy, France).

2.7. EGFR mRNA assays by real-time reverse transcriptase PCR

Complementary DNA was synthesized from 2 μ g of total RNA using the Transcriptor First Strand Complementary DNA Synthesis kit (Roche, Boulogne-Billancourt, France) and hexamer primers according to manufacturer's protocol. PCR primer sequences and locations were carefully selected to amplify the sequences corresponding to EGFRv1, EGFRv2, EGFRv3, EGFRv4, EGFRvIII, and hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT) as previously described [15] and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and TATA box binding protein (TBP; Table 3). The melting temperatures of the primer pairs were 58°C (v1, v2, v3, and HPRT) and 60°C (v4, EGFRvIII, GAPDH, and TBP). Quantitative (v1, v2, v3, v4, HPRT, GAPDH, and TBP) and qualitative (EGFRvIII) PCRs were performed on a Rotor Gene thermocycler (Qiagen) using the Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I kit (Roche). All targets were amplified in the presence of 3 mM MgCl₂ and 0.2 μ M (v4, vIII), 0.25 μ M (GAPDH), or 0.5 μ M (v1, v2, v3, HPRT, TBP) primers. The mRNAs were assayed using the $\Delta\Delta$ Ct method ($[Ct_{\text{sample}} - Ct_{\text{calibrator}}]_{\text{interest gene}} - [Ct_{\text{sample}} - Ct_{\text{calibrator}}]_{\text{reference gene}}$), modified according to Pfaffl [26], with efficiency correction by the Rotor Gene Software (Qiagen). Results are expressed in relative arbitrary units. For each gene of interest, the values were normalized to those for the 3 internal control genes: *HPRT*, *GAPDH*, and *TBP*. Median values were used as cut-offs to define weak and strong expression for each variant and for the sum of all variants.

2.8. Statistical analysis

StatView 5.0 (SAS Institute, Inc, Cary, NC) and R 2.10.1 (Department of Biometry and Evolutionary Biology, Lyon,

Table 3 Oligonucleotides used for reverse transcription PCR amplification

Oligonucleotide	Sequence 5' to 3'
<i>GAPDH</i> exon 6 forward	AGATCCCTCCAAATCAAGTGG
<i>GAPDH</i> exon 7 reverse	GCCAGAGATGATGACCCTTTT
<i>TBP</i> exon 6 forward	GAGCTGTGATGTGAAGTTTCC
<i>TBP</i> exon 7 reverse	TCTGGGTTTGATCATTCTGTAG

France) software were used for statistical analyses. Correlations between quantitative variables were assessed using the Spearman test. Fisher exact test was used to assess differences between nominal variables. Means were compared using the nonparametric Mann-Whitney test for pairs of variables and the Kruskal-Wallis test for comparisons of more than 2 variables. PFS and OS were studied using the Kaplan-Meier analysis, and PFS or OS medians were compared using the nonparametric log-rank test. Multivariate Cox regression analysis was used to examine the relative impact on outcome of the variables with $P < .20$ in univariate analysis. Results for which $P < .05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Patient characteristics

Clinical and histologic features of the series are given in Table 4. Fig. 1 illustrates ITAC histologic subtypes in the series, according to the WHO classification [2], that is, papillary, colonic, mucinous, or mixed. The prevalence of

Table 4 Clinical and histologic features

	Histologic subtype				
	All (n = 39)	Papillary (n = 3)	Colonic (n = 23)	Mucinous (n = 4)	Mixed (n = 9)
Median age (y; range, 50-87)					
≤68	20	1	14	2	3
>68	19	2	9	2	6
Sex					
Male	37	3	22	4	8
Female	2	0	1	0	1
Localization					
Ethmoid	37	2	22	4	9
Nasal cavity	2	1	1	0	0
Wood dust exposure					
Yes	35	2	21	4	8
No	4	1	2	0	1
Histologic vascular invasion					
Yes	5	0	4	0	1
No	34	3	19	4	8
Tumor stage (T)					
T1	1	0	0	1	0
T2	18	3	11	1	3
T3	12	0	7	1	4
T4	8	0	5	1	2
Surgical resection					
Complete	35	3	21	3	8
Incomplete	4	0	2	1	1
Radiotherapy					
Yes	38	3	23	4	8
No	1	0	0	0	1
Chemotherapy (cisplatin)					
Yes	8	0	5	1	2
No	31	3	18	3	7

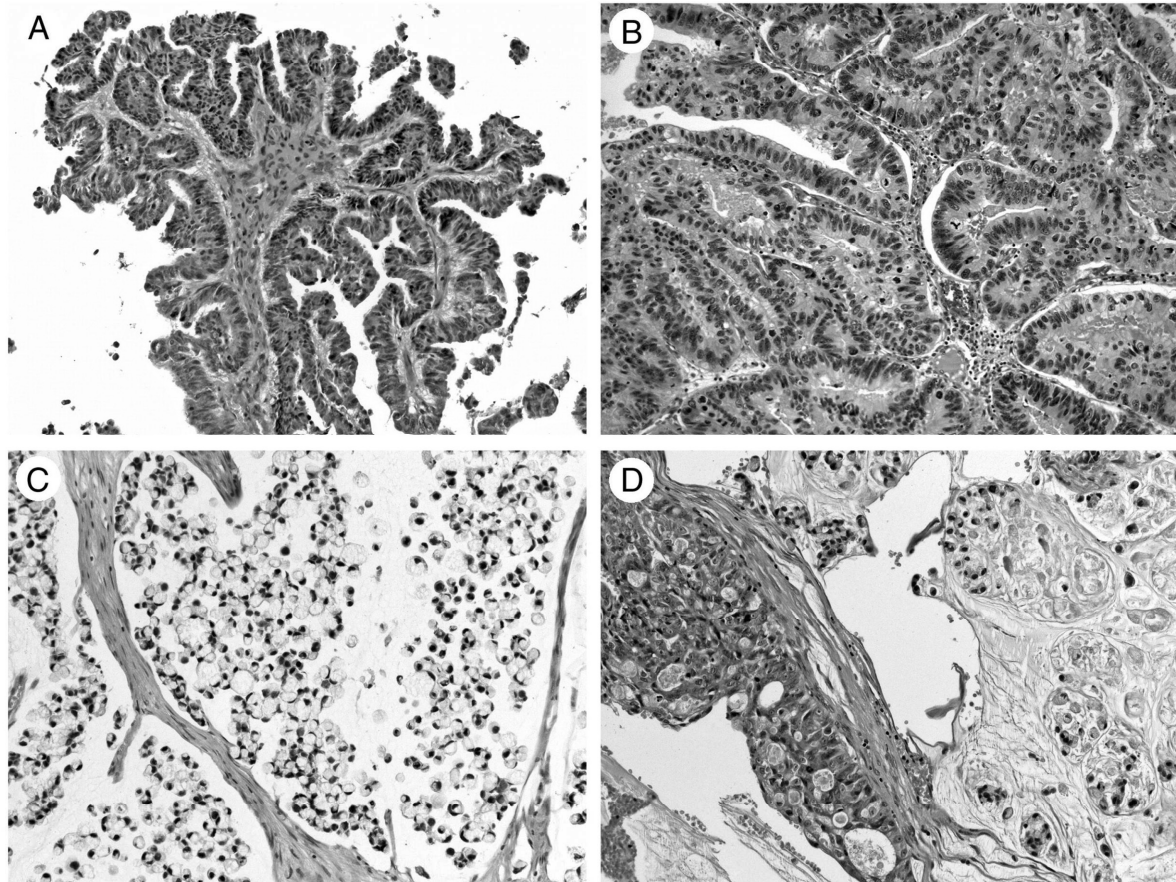


Fig. 1 Histologic ITAC subtypes, according to the Barnes classification. A, Papillary: papillary architecture and minimal cytologic atypia. B, Colonic: glandular tumor structures and increased nuclear pleomorphism. C, Mucinous: numerous signet ring cells within an abundant mucin matrix. D, Mixed (transitional): admixture of these patterns, for example, colonic and mucinous types.

ITAC histologic subtypes did not differ significantly according to demographic or clinical characteristics.

3.2. IHC analysis of EGFR protein

IHC results are given in Table 5. Twenty-five cases (64.1%), including 3 papillary, 14 colonic, 3 mucinous, and 5 mixed histologic subtypes, were positive with ECD-Ab and ICD-Ab. The other 14 cases (35.9%) were negative with both antibodies. The staining intensities obtained with ECD-Ab and ICD-Ab were strongly correlated ($P < .0001$). In positive cases, EGFR staining was heterogeneous. The protein expression was limited to tumor foci that were unevenly distributed. In addition, positive foci showed variable staining intensity that could be weak, moderate, or strong and were often surrounded by negative tumor tissue (Fig. 2A). Whatever the histologic subtype, at least 2 staining intensities were observed within each positive tumor. Positive cells always exhibited membrane labeling (Fig. 2B).

Four tumors (10.3%) showed strong EGFR immunoreactivity. All these cases corresponded to histologic colonic subtypes. Tumor foci with strong ECD-Ab staining

Table 5 IHC results with anti-EGFR antibodies according to staining intensity

	ECD-Ab (n = 39)	ICD-Ab (n = 39)	pEGFR-Ab (n = 25) ^a
Strong	4	4	0
Moderate	12	8	2 ^b
Weak	9	3	0
Negative	14	24	23

NOTE. ECD-Ab, ICD-Ab, and pEGFR-Ab are antibodies recognizing the EGFR ECD and ICD and phosphorylated tyrosine 1068, respectively.

^a pEGFR-Ab was used only with tumors positive for ECD-Ab and/or ICD-Ab.

^b Observed in 2 cases with high staining intensity with both ECD-Ab and ICD-Ab.

overlapped with those with strong ICD-Ab staining (Fig. 2C and D). Membrane staining was often associated with cytoplasmic staining. In 2 of these 4 tumors, a pEGFR protein was observed, restricted to tumor areas with strong ECD-Ab and ICD-Ab staining (Fig. 2E). In the remaining 21 EGFR-positive tumors, the staining was weak or moderate (Fig. 2F), and no pEGFR was detected.

There was no relationship between EGFR staining and demographic variables, wood dust exposure, or histologic subtypes according to WHO classification and tumor stage.

3.3. FISH analysis of *EGFR* gene copy number

Interpretable FISH results were obtained for 36 cases. Eighteen cases (50%) presented *EGFR*-CNG resulting from *EGFR* gene amplification and/or chromosome 7 polysomy. Gene amplification was, in all cases, restricted to tumor foci, and there was no gene amplification in the surrounding tumor tissue. In contrast, tumor cells with polysomy were more evenly distributed throughout the tumor tissue. Three cases (8.3%) presented an *EGFR* gene amplification (Fig. 2G), and 2 of these 3 also had chromosome 7 polysomy. The other 15 cases (41.6%) had a chromosome 7 polysomy (Fig. 2H) without gene amplification. Interestingly, in the 3 cases with *EGFR* amplification, tumor areas identified by FISH to harbor the gene amplification coincided with the areas with strong EGFR protein expression as assessed by IHC. In 2 of these 3 cases, pEGFR protein was restricted to tumor areas with gene amplification (Table 6). In contrast, in tumors with polysomy without gene amplification, the intensity of staining with ECD-Ab and ICD-Ab was moderate, weak, or negative, and there was no pEGFR expression. There were no significant associations between the presence of *EGFR* amplification or chromosome 7 polysomy and demographic variables, wood dust exposure, histologic subtype, or tumor stage.

3.4. *EGFR*, *KRAS*, and *BRAF* mutations

Among the 34 cases tested, only 1 (2.9%) had a mutation in the sequence encoding the *EGFR* tyrosine kinase domain. This mutation was a 15-base-pair deletion in exon 19, corresponding to a 5-amino-acid deletion referred to as p.E746_A750del (c.2235del15). We did not find any of the sought mutations in *EGFR* exons 18, 20, or 21.

The *KRAS* mutation p.G13D (c.38G>A) was present in 2 tumors (5.9%). No mutation was detected in codon 12 of

KRAS. *BRAF* mutations were observed in 2 wild-type *KRAS* ITACs, one was p.V600E (c.1799T>A) and the other was p.D594G (c.1781A>G).

EGFR, *KRAS*, and *BRAF* mutations were mutually exclusive and not observed in tumors with *EGFR* amplification. There were no significant associations between *EGFR*, *KRAS*, and *BRAF* mutations and histologic subtype or tumor stage.

3.5. *EGFRv1*, *EGFRv3*, and *EGFRv4* mRNAs

All tumors contained *EGFRv1*, *EGFRv3*, and *EGFRv4* mRNAs, whereas only 2 contained *EGFRv2* mRNA. *EGFRv1* mRNA levels were strongly correlated with those of *EGFRv3* and *EGFRv4* ($P < .0001$; Fig. 3A-C). The *EGFRvIII* mutant mRNA was not detected in any case. All cases with *EGFR* gene amplification had strong expression of total EGFR variant mRNAs (sum of *EGFRv1*, *EGFRv3*, and *EGFRv4* mRNAs expression levels; $P = .05$; Fig. 3D). There were no significant associations between the expression level of any variant mRNA and demographic variables, wood dust exposure, histologic subtype, or tumor stage.

3.6. Relationships with tumor PFS and OS

At the time of analysis, the median PFS was 140.1 months with 12 recurrences (30.8%), and the median survival was 92.5 months with 14 deaths (35.9%). OS was significantly lower for patients with tumors with incomplete surgical resection ($P = .002$), histologically demonstrated vascular invasion ($P = .02$), and strong expression of *EGFRv1* mRNA ($P = .03$). PFS and OS were not associated with demographic variables, histologic subtype, tumor stage, EGFR protein overexpression, pEGFR expression, *EGFR* amplification, chromosome 7 polysomy, or the presence or absence of *EGFR*, *KRAS*, or *BRAF* mutations. Multivariate Cox regression analysis confirmed that OS was significantly lower only for patients with incomplete surgical resection of the tumors ($P = .003$).

4. Discussion

Intestinal-type sinonasal adenocarcinomas are rare and aggressive tumors, sharing morphologic and IHC features with colorectal adenocarcinomas. In a series of 39 ITACs, we studied gene expression, searched for mutations of genes

Fig. 2 IHC and FISH. A, Heterogeneity of EGFR protein expression with strong, moderate, weak, and negative stained areas (ICD-Ab). B, Strong EGFR protein expression with membranous staining, with or without a cytoplasmic staining (ICD-Ab). C and D, Tumor focus with strong ICD-Ab staining (C) corresponding to those with strong ECD-Ab staining (D). E, pEGFR-Ab: staining scored as moderate (inset, higher magnification). F, Staining with ECD-Ab scored as moderate (inset, higher magnification). G, *EGFR* gene amplification with numerous *EGFR* clusters (closely spaced groupings of 4 or more green signals) per nucleus in at least 10% of the cells analyzed (Zytolight SPEC *EGFR*/CEN7 Dual Color Probe). H, Chromosome 7 polysomy with 3 or more centromere 7 signals (red) per nucleus in more than 30% of the cells analyzed (Zytolight SPEC *EGFR*/CEN7 Dual Color Probe). ECD-Ab, ICD-Ab, and pEGFR-Ab: antibodies recognizing the EGFR ECD, ICD, and phosphorylated tyrosine 1068, respectively.

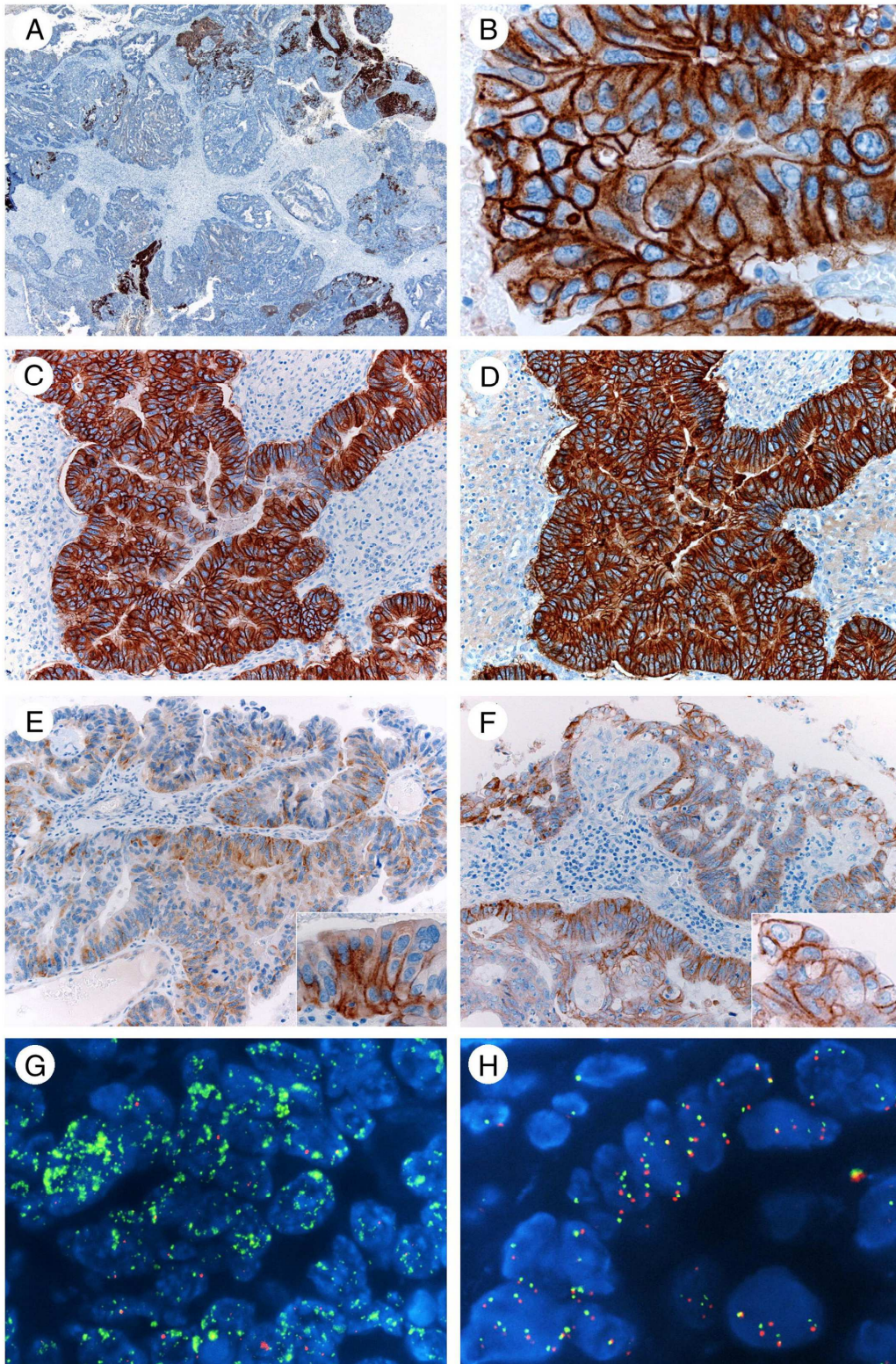


Table 6 Relationship between FISH and IHC findings for EGFR

FISH study of <i>EGFR</i>	IHC study of EGFR									
	ECD-Ab				ICD-Ab				pEGFR-Ab ^a	
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+
Amplification (n = 3)	0	0	0	3	0	0	0	3	1	2
<i>P</i>	<.0001				<.0001				.0002	
Polysomy (n = 15)	3	4	8	0	7	2	6	0	12	0
<i>P</i>	.06				.06				.14	
None ^b (n = 18)	9	5	4	0	15	1	2	0	9	0
<i>P</i>	.08				.04				.26	
Failed (n = 3)	2	0	0	1	2	0	0	1	1	0
All (n = 39)	14	9	12	4	24	3	8	4	23	2

NOTE. ECD-Ab, ICD-Ab, and pEGFR-Ab are antibodies recognizing the EGFR ECD, ICD, and phosphorylated tyrosine 1068, respectively, according to staining intensity: strong (+++), moderate (++) , weak (+), and negative (-).

^a pEGFR-Ab was used only for tumors positive for ECD-Ab and/or ICD-Ab (n = 25).

^b Case without *EGFR* amplification or chromosome 7 polysomy.

involved in the signal transmission process, and analyzed the patterns of EGFR protein expression.

IHC and FISH analysis revealed substantial tumor heterogeneity. IHC evidenced EGFR expression in about

two-thirds of the cases and overexpression in 4 tumors. *EGFR*-CNG was observed in half of our series, and gene amplification was present in only 3 tumors. The different EGFR expression patterns were not related to the histologic

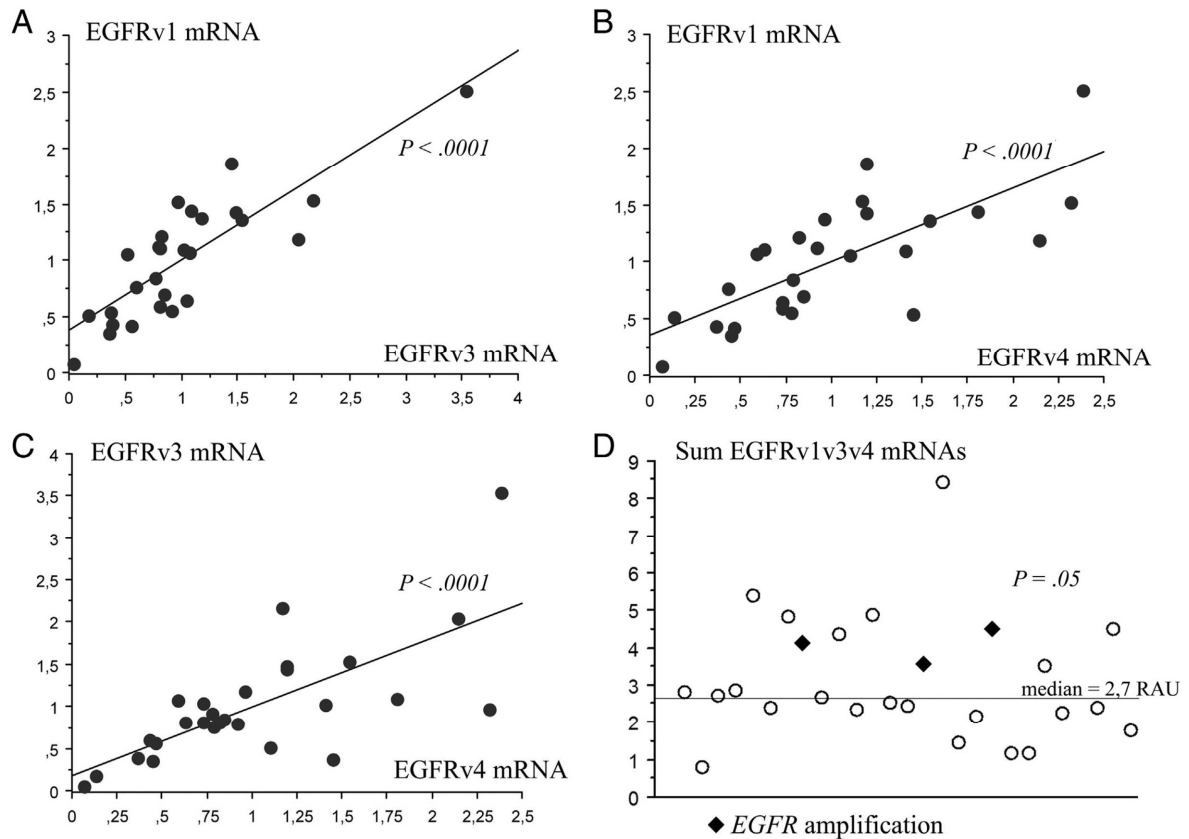


Fig. 3 Analysis of EGFR mRNAs. A and B, EGFRv1 mRNA levels were strongly correlated with those of EGFRv3 mRNA and EGFRv4 mRNA ($P < .0001$). C, EGFRv3 mRNA levels were also strongly correlated with those of EGFRv4 mRNA ($P < .0001$). D, Cases with *EGFR* gene amplification had strong expression levels of EGFR variants as a whole (sum of EGFRv1, v3 and v4 mRNAs; $P = .05$).

subtype. When present, *EGFR* amplification was unevenly distributed in the tumor tissue and restricted to small tumor foci. IHC findings were similarly heterogeneous: protein overexpression was limited to circumscribed areas, which clearly stood out from the rest of the tumor. Interestingly, tumor foci harboring *EGFR* amplification also overexpressed the EGFR protein. Thus, IHC, a straightforward technique, could serve as a guide for FISH investigations. In view of the heterogeneity of these tumors, the whole tumor block should be assessed.

It is likely that the overexpression involved the whole EGFR receptor (HER1) because we obtained similar results with antibodies directed against both the extracellular and the intracellular domain. In 2 tumors, the presence of pEGFR protein in the areas with protein overexpression and gene amplification is consistent with the EGFR pathway being activated. Conversely, in the tumors that did not express pEGFR, the pathway may not be activated, but it cannot be excluded that the intracellular tyrosine kinase domain could be activated by phosphorylation at a site other than that recognized by the pEGFR-Ab we used. Furthermore, additional mechanisms of EGFR pathway activation, like heterodimerization of EGFR with other tyrosine kinase receptors such as HER3, have been described in other tumor types [27] and remain to be explored in ITACs. Another important mechanism regulating the EGFR pathway is the endocytic sorting of the receptor. Upon ligand binding, EGFR is internalized and trafficked to endosomes. Whether the receptor is recycled to the plasma membrane—and thus immediately able to reactivate EGFR signaling—or transported to lysosomes for degradation depends on the nature of the ligand [28]. Consequently, the involvement of the EGFR pathway in ITAC oncogenesis could also depend on the ability of various ligands to induce receptor recycling rather than degradation. Regarding the IHC data, the internalization of the receptor could explain the cytoplasmic staining that can be observed in certain cells in association with the membrane staining.

In contrast to gene amplification, tumor cells with chromosome 7 polysomy were more evenly distributed in the tumor tissue, and there was no relationship with EGFR protein expression as visualized by IHC. In these cases, pEGFR was not detected. Gene amplification and chromosome polysomy are 2 different biological mechanisms that both lead to *EGFR*-CNG. Oncogene amplification is a crucial step in malignant transformation and could be involved in secondary resistance to therapy [15,29]. Polysomy reflects an intrinsic chromosomal instability in tumor cells and does not have the same biological significance regarding prognosis and response to therapy [29]. Therefore, clinical and pathologic investigations should aim to distinguish between these cytogenetic abnormalities.

In addition to their morphologic similarities, ITACs and colorectal adenocarcinomas share common alterations of the EGFR pathway. In our series, 8.3% and 41.6% of cases showed *EGFR* amplification and chromosome 7 polysomy, respectively. This is consistent with the literature on ITACs

(amplification in 8%-14% and polysomy in 33%-46% of cases) [20,21] and on colorectal adenocarcinomas (6%-51% amplification and at least 30% polysomy) [30]. Moreover, these 2 tumor types seem to share similar EGFR patterns: focal distribution of *EGFR* gene amplification with the zones of EGFR protein overexpression overlapping these foci [31,32]. Genetic intratumor heterogeneity has been reported in advanced colorectal carcinoma [33] and may contribute to treatment failure and drug resistance [34]. In our series, tumor subclones with *EGFR* amplification and protein overexpression were observed in advanced tumor stages (T3 or T4), but the predictive value of these abnormalities remains to be explored in ITACs.

EGFR gene mutations were rare in our series. We found a mutation in only 1 of 34 cases, an exon 19 deletion. This observation agrees with previous reports for both ITACs [21] and colorectal adenocarcinomas [10]. Such *EGFR* mutations are more frequent in lung adenocarcinomas [9]. To our knowledge, our study is the first to report the noninvolvement of the EGFRvIII mutant in the oncogenesis of ITACs. This is also a characteristic of colorectal adenocarcinoma [12], contrasting with other tumor types [11]. The low frequency of *KRAS* and *BRAF* mutations in our series (5.9% each, in 4 different tumors) is in agreement with the literature [19,21,22]. *KRAS* and *BRAF* mutations are more frequent in colorectal adenocarcinomas and occur in about 30% and 12% of such cases, respectively [8,35].

In our study, multivariate analysis identified only the extent of the surgical resection as a prognostic factor regarding OS, as previously described [3]. In agreement with Garcia et al [21], we did not find any significant association between the molecular markers tested and either OS or PFS.

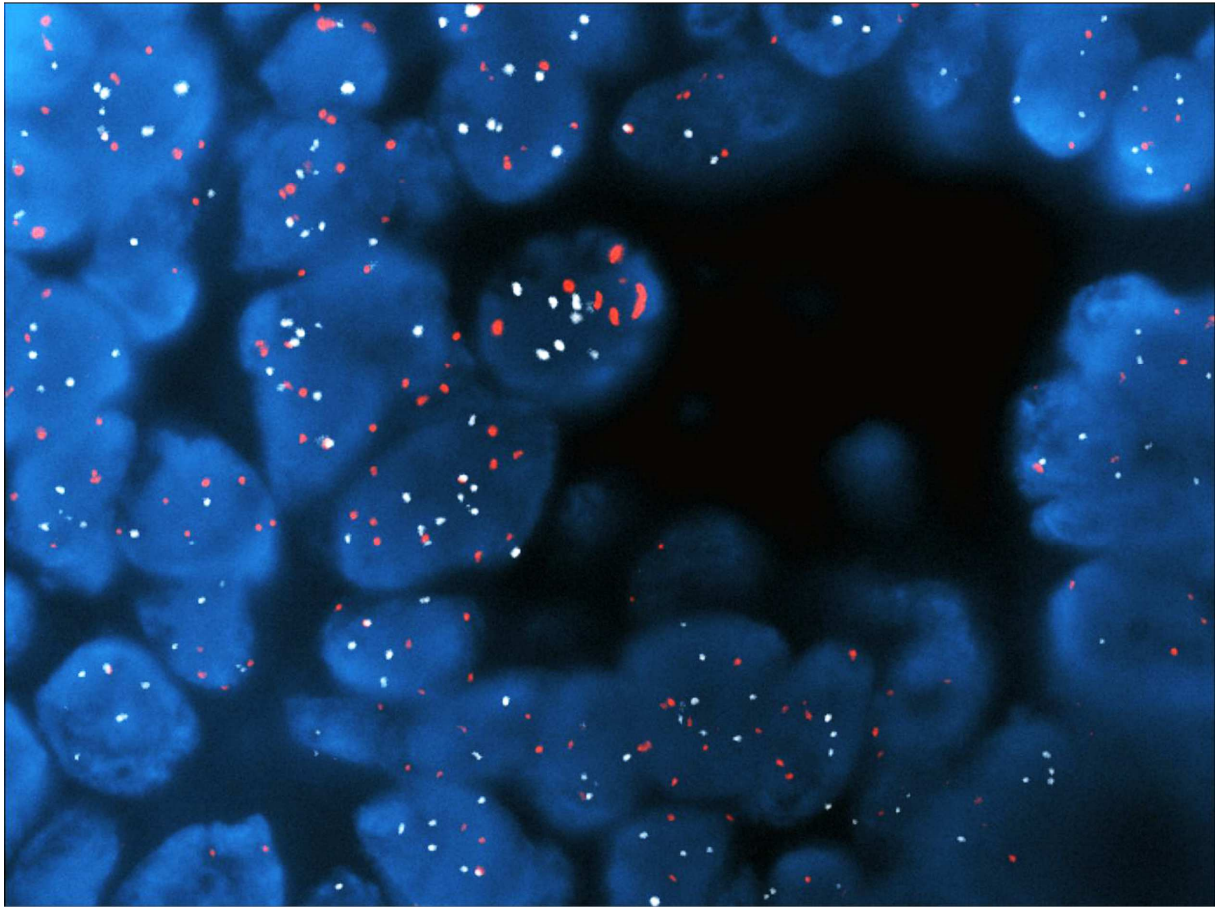
In conclusion, our study revealed various EGFR expression patterns in ITACs and thereby indicates tumor heterogeneity. FISH analysis of *EGFR* amplification should be guided by IHC and should, in particular, distinguish between amplification of the *EGFR* gene and chromosome 7 polysomy, a different mechanism of *EGFR*-CNG with a different biological significance. In addition to their morphologic similarities, ITACs and colorectal adenocarcinomas share common alterations of the EGFR pathway (ie, *EGFR* amplification, *EGFR* protein overexpression, the absence of involvement of EGFRvIII mutants, and low frequencies of *EGFR* mutations); the major difference lies in the lower frequency of *KRAS* and *BRAF* mutations in ITACs. These observations suggest that it may be beneficial to assess anti-EGFR-targeted therapies in further preclinical and clinical studies.

References

- Turner JH, Reh DD. Incidence and survival in patients with sinonasal cancer: a historical analysis of population-based data. *Head Neck* 2012;34:877-85.
- Franchi A, Santucci M, Wenig BM. Adenocarcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Richart P, Sidransky D, editors. *Pathology and genetics of*

- head and neck tumours. WHO classification of tumours. Lyon: IARC Press; 2005. p. 20-3.
- [3] Cantu G, Solero CL, Mariani L, et al. Intestinal type adenocarcinoma of the ethmoid sinus in wood and leather workers: a retrospective study of 153 cases. *Head Neck* 2011;33:535-42.
- [4] Mills SE, Gaffey MJ, Frierson HF. Tumors of the upper aerodigestive tract and ear. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 2000.
- [5] Choussy O, Ferron C, Vedrine PO, et al. Adenocarcinoma of ethmoid: a GETTEC retrospective multicenter study of 418 cases. *Laryngoscope* 2008;118:437-43.
- [6] Yen LC, Uen YH, Wu DC, et al. Activating KRAS mutations and overexpression of epidermal growth factor receptor as independent predictors in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *Ann Surg* 2010;251:254-60.
- [7] Yang ZY, Shen WX, Hu XF, et al. EGFR gene copy number as a predictive biomarker for the treatment of metastatic colorectal cancer with anti-EGFR monoclonal antibodies: a meta-analysis. *J Hematol Oncol* 2012;5:52.
- [8] Heinemann V, Stintzing S, Kirchner T, Boeck S, Jung A. Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treat Rev* 2009;35:262-71.
- [9] Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res* 2004;64:8919-23.
- [10] Metzger B, Chambeau L, Begon DY, et al. The human epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in European patients with advanced colorectal cancer harbors infrequent mutations in its tyrosine kinase domain. *BMC Med Genet* 2011;12:144.
- [11] Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, et al. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* 1995;55:5536-9.
- [12] Spindler KL, Olsen DA, Nielsen JN, et al. Lack of the type III epidermal growth factor receptor mutation in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2006;26:4889-93.
- [13] Maramotti S, Paci M, Micciche F, et al. Soluble epidermal growth factor receptor isoforms in non-small cell lung cancer tissue and in blood. *Lung Cancer* 2012;76:332-8.
- [14] Guillaudeau A, Durand K, Bessette B, et al. EGFR soluble isoforms and their transcripts are expressed in meningiomas. *PLoS One* 2012;7:e37204.
- [15] Guillaudeau A, Durand K, Rabinovitch-Chable H, et al. Adult diffuse gliomas produce mRNA transcripts encoding EGFR isoforms lacking a tyrosine kinase domain. *Int J Oncol* 2012;40:1142-52.
- [16] Shia J, Klimstra DS, Li AR, et al. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Mod Pathol* 2005;18:1350-6.
- [17] Guillaudeau A, Durand K, Pommepuy I, et al. Determination of EGFR status in gliomas: usefulness of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009;17:220-6.
- [18] Park JH, Han SW, Oh DY, et al. Analysis of KRAS, BRAF, PTEN, IGF1R, EGFR intron 1 CA status in both primary tumors and paired metastases in determining benefit from cetuximab therapy in colon cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011;68:1045-55.
- [19] Bornholdt J, Hansen J, Steiniche T, et al. K-ras mutations in sinonasal cancers in relation to wood dust exposure. *BMC Cancer* 2008;8:53.
- [20] Franchi A, Fondi C, Paglierani M, Pepi M, Gallo O, Santucci M. Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in sinonasal intestinal type adenocarcinoma. *Oral Oncol* 2009;45:835-8.
- [21] Garcia-Inclan C, Lopez F, Perez-Escuredo J, et al. EGFR status and KRAS/BRAF mutations in intestinal-type sinonasal adenocarcinomas. *Cell Oncol (Dordr)* 2012;35:443-50.
- [22] Lopez F, Garcia Inclan C, Perez-Escuredo J, et al. KRAS and BRAF mutations in sinonasal cancer. *Oral Oncol* 2012;48:692-7.
- [23] Polosa R, Prosperini G, Tomaselli V, Howarth PH, Holgate ST, Davies DE. Expression of c-erbB receptors and ligands in human nasal epithelium. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:1124-31.
- [24] Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer* 2001;92:1331-46.
- [25] Varella-Garcia M, Diebold J, Eberhard DA, et al. EGFR fluorescence in situ hybridisation assay: guidelines for application to non-small-cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2009;62:970-7.
- [26] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
- [27] Hsieh AC, Moasser MM. Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target HER3. *Br J Cancer* 2007;97:453-7.
- [28] Roepstorff K, Grandal MV, Henriksen L, et al. Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2009;10:1115-27.
- [29] Seshoue R, Le Pessot F, Di Fiore F, Frebourg T. EGFR alterations and response to anti-EGFR therapy: is it a matter of gene amplification or gene copy number gain? *Br J Cancer* 2012;106:426-7.
- [30] Custodio A, Feliu J. Prognostic and predictive biomarkers for epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer: beyond KRAS mutations. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013;85:45-81.
- [31] Personeni N, Fieuws S, Piessevaux H, et al. Clinical usefulness of EGFR gene copy number as a predictive marker in colorectal cancer patients treated with cetuximab: a fluorescent in situ hybridization study. *Clin Cancer Res* 2008;14:5869-76.
- [32] Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, et al. Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *J Clin Oncol* 2007;25:3238-45.
- [33] Baisse B, Bouzourene H, Saraga EP, Bosman FT, Benhattar J. Intratumor genetic heterogeneity in advanced human colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2001;93:346-52.
- [34] Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883-92.
- [35] Zlobec I, Bihl MP, Schwarb H, Terracciano L, Lugli A. Clinicopathological and protein characterization of BRAF- and K-RAS-mutated colorectal cancer and implications for prognosis. *Int J Cancer* 2010;127:367-80.

Annexe 2.



Exemple d'un ITAC avec une polysomie des chromosomes 12 et 17 (FISH x1000, Laboratoire de Cytogénétique, CHU Limoges).

Cinq ITACs présentant une polysomie du chromosome 7 ont été étudiés en FISH sur les mêmes sections tissulaires avec des sondes ciblant les centromères des chromosomes 12 et 17 respectivement révélées par un signal rouge et bleu (CEP 12 SpectrumOrange DNA Probe et CEP 17 D17Z1 SpectrumAqua Probe ; Vysis, Abbott, Rungis, France). Ces cinq tumeurs présentaient une polysomie (au moins trois signaux centromériques dans plus de 30 % des noyaux analysés) du chromosome 12, et trois d'entre elles présentaient aussi une polysomie du chromosome 17.

Serment d'Hippocrate

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Etude de l'expression de l'EGFR et des mutations de *KRAS* et *BRAF* dans les adénocarcinomes naso-sinusiens de type intestinal.

Les adénocarcinomes naso-sinusiens de type intestinal (ITACs) sont des tumeurs rares, définies par leur ressemblance morphologique avec les adénocarcinomes colorectaux (CCRs). Leur potentiel de récurrence loco-régional en fait des tumeurs de mauvais pronostic. L'*epidermal growth factor receptor* (EGFR) est un récepteur tyrosine kinase impliqué dans l'oncogenèse de nombreux cancers comme les CCRs. Son implication dans l'oncogenèse des ITACs est suspectée.

Dans une première série de 39 cas, nous avons étudié les expressions protéique et génique de l'EGFR, le nombre de copies du gène et son statut mutationnel, ainsi que celui de *KRAS* et *BRAF*. Dans une seconde série de 72 cas, nous avons étudié l'EGFR sur le plan protéique et génique, ainsi que MET et HER2, deux autres récepteurs parfois en interaction avec l'EGFR.

L'expression protéique de l'EGFR était fréquente (75 % des cas). L'amplification de l'*EGFR* était rare (6 % des cas) et focale. Elle s'accompagnait d'une surexpression protéique, à l'inverse de la polysomie du chromosome 7, elle-même fréquente (49 % des cas). Les mutations de l'*EGFR*, de *KRAS* et *BRAF* étaient rares. La surexpression protéique (3+) de MET était observée dans 17 % et celle de HER2 dans 3 % des tumeurs. Aucune tumeur ne présentait d'amplification de *MET*.

Le stade tumoral, la qualité d'exérèse et certains aspects histologiques avaient une valeur pronostique contrairement aux marqueurs moléculaires étudiés.

Les patients atteints de ce type d'adénocarcinomes qui expriment l'EGFR et présentent rarement des mutations de *KRAS* ou de *BRAF*, pourraient faire l'objet d'essais cliniques avec des thérapies ciblées anti-EGFR.

EGFR ; MET ; HER2 ; immunohistochimie ; amplification ; adénocarcinomes naso-sinusiens de type intestinal

Epidermal growth factor receptor expression and *KRAS* and *BRAF* mutations in sinonasal intestinal-type adenocarcinomas

Sinonasal intestinal-type adenocarcinomas (ITACs) are uncommon tumors, defined by their morphological similarities to colorectal adenocarcinomas (CCRs). Due to their high potential for locoregional recurrence, these tumors are of poor prognosis. The epidermal growth factor receptor (EGFR) is a tyrosine kinase receptor involved in the oncogenesis of many cancers such as CCRs. Its involvement in ITACs oncogenesis is suspected.

In a series of 39 ITACs, we firstly investigated EGFR protein and mRNA expression, *EGFR* gene copy number, and *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* mutational status. Secondly, in a series of 72 ITACs, we investigated EGFR protein expression, *EGFR* gene copy number, and MET and HER2, two others receptors which may interact with EGFR.

In our series, ITACs frequently expressed EGFR protein (75% of the cases). *EGFR* gene amplification was rare (6% of the cases) and focal. Gene amplification was associated with protein overexpression. In contrast, polysomy of chromosome 7 was frequent (49% of the cases) but not related to protein overexpression. Mutations of *EGFR*, *KRAS* and *BRAF* were rare. MET and HER2 protein overexpression (3+) was observed in 17% and 3% of the tumors respectively. No tumor had *MET* amplification.

Advanced tumor stage, incomplete surgical resection and some histological features such as solid or mucinous components were associated with poor prognosis. None of the studied molecular markers significantly influenced the prognosis.

Patients with this type of adenocarcinomas that express EGFR and rarely have mutations in *KRAS* or *BRAF* genes might benefit from therapeutic trials with anti-EGFR targeted therapies.