

Académie d'Orléans –Tours
Université François-Rabelais

FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

Année 2013-2014

N°

Thèse
pour le
DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'Etat

Par

Marie-Agnès BY
Née le 28 Juillet 1985 à AVRANCHES (50)

Présentée et soutenue publiquement le 24 Juin 2014

TITRE

**Etude du rôle pronostique des polymorphismes du VEGF dans le carcinome rénal
métastatique à cellules claires**

Jury

Président de Jury : Monsieur le Professeur Claude LINASSIER

Membres du jury : Madame le Professeur Gaëlle FROMONT-HANKARD
Monsieur le Professeur Claude LINASSIER
Monsieur le Professeur Franck BRUYERE
Madame le Docteur Valérie GOUILLEUX
Madame le Docteur Bérangère NARCISO

RESUME

Introduction : Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) joue un rôle fondamental dans la physiopathologie du carcinome rénal à cellules claires. Une cinquantaine de polymorphismes de nucléotide simple (SNP) ont été décrits pour le gène de VEGF. Le but de ce travail était d'étudier l'influence de certains SNPs du VEGF, ayant démontré une implication en pathologie tumorale, sur le pronostic du cancer du rein et la réponse aux différentes thérapeutiques anti-angiogéniques tels que le sunitinib, bevacizumab, temsirolimus, everolimus, sorafénib, axitinib et pazopanib.

Matériels et méthodes : Il s'agit d'une étude rétrospective, unicentrique portant sur 59 patients atteints d'un carcinome à cellules claires métastatique traité par anti-angiogéniques. Cinq SNPs du VEGF (-2549 D/I, -460 C/T, -1154 G/A, +405 G/C, +936 C/T) étaient analysés par deux techniques de PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism et PCR multiplex).

Résultats : La survie globale depuis le diagnostic était significativement meilleure chez les patients porteurs du SNP +936 C/C par rapport au SNP+936 C/T (médiane 77 mois vs 26 mois $p=0,021$). Cette augmentation de la survie globale était indépendante de la durée de la survie sans métastase mais était liée à une augmentation de la survie globale en phase métastatique et notamment la survie sans progression en 1^{ère} ligne de traitement. Les patients porteurs du SNP 936 C/C avait une survie globale métastatique de 67 mois vs 22 mois pour le SNP 936 C/T ($p=0,006$). Les autres SNPs n'avaient pas de valeur pronostique. Le polymorphisme +936 conservait une valeur pronostique indépendante du score de Heng en analyse multivariée tant sur la survie globale en phase métastatique que sur la survie sans progression. Par contre la survie globale depuis le diagnostic n'était pas corrélée au SNP 936.

Discussion et conclusion: Le polymorphisme +936 C/T semble avoir un rôle pronostique sur la survie dans le cancer du rein en phase métastatique. Il ne modifie pas la durée de la phase pré-métastatique mais semble influencer la durée de la période métastatique. Ce SNP pourrait modifier l'évolutivité de la maladie par une variabilité inter-individuelle de l'intensité de l'angiogénèse et la sensibilité aux traitements anti-angiogéniques.

Une étude confirmatoire sur un plus grand échantillon serait nécessaire pour confirmer ces résultats.

Mots clés : Carcinome rénal à cellules claires, métastases, VEGF, polymorphisme de nucléotide simple, facteur pronostique

ABSTRACT

Introduction: Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) plays an important role in the pathophysiology of clear-cell renal cell carcinoma. Fifty single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been described for the VEGF gene. The aim of this work was to study the influence of certain VEGF gene polymorphism, which has demonstrated involvement in tumor pathology, in the prognosis of kidney cancer and response to various anti-angiogenic therapies such as sunitinib, bevacizumab, temsirolimus, everolimus, sorafenib, axitinib and pazopanib.

Materials and Methods: This is a retrospective single center study, on 59 patients with metastatic clear-cell renal cell carcinoma treated with anti -angiogenic. Five SNPs of VEGF (-2549 D/I, -460 C/T, -1154 G/A, +405 G/C, +936 C/T) were analyzed by two PCR techniques (Restriction Fragment Length Polymorphism and multiplex PCR)

Results: Overall survival from diagnosis was significantly better for patients carrying SNP +936 C/C compared to patient with SNP +936 C/T (median 77 months vs 26 months $p = 0.021$). This increase in overall survival was independent of the duration of the metastasis-free survival but was associated with an increase in metastatic overall survival including progression-free survival in first-line treatment. Patients carrying SNP +936 C/C had a metastatic overall survival of 67 months vs 22 months for patients with SNP +936 C/T ($p = 0.006$). Other SNPs had no prognostic value. In multivariate analysis, SNP 936 remained an independent prognostic factor after adjustment for Heng score both on metastatic overall survival and progression-free survival. Overall survival from diagnosis was not correlated to the SNP +936.

Discussion and Conclusion: Polymorphism + 936 C/T seems to be a prognostic factor on survival in metastatic clear-cell renal cell carcinoma. It does not change the duration of the pre-metastatic phase but appears to influence the duration of metastatic period. This SNP could alter the progression of the disease by inter-individual variability in the intensity of angiogenesis and sensitivity to anti-angiogenic therapies. A confirmatory study on a larger sample would be needed to confirm these results.

Key words: clear-cell renal cell carcinoma, metastatic, VEGF, single nucleotide polymorphism, prognostic factor

UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN

Professeur Patrice DIOT

VICE-DOYEN

Professeur Henri MARRET

ASSESSEURS

Professeur Denis ANGOULVANT, *Pédagogie*
Professeur Mathias BUCHLER, *Relations internationales*
Professeur Hubert LARDY, *Moyens – relations avec l'Université*
Professeur Anne-Marie LEHR-DRYLEWICZ, *Médecine générale*
Professeur François MAILLOT, *Formation Médicale Continue*
Professeur Philippe ROINGEARD, *Recherche*

SECRETAIRE GENERALE

Madame Fanny BOBLETER

DOYENS HONORAIRES

Professeur Emile ARON (†) – 1962-1966
Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962
Professeur Georges DESBUQUOIS (†)- 1966-1972
Professeur André GOUAZÉ - 1972-1994
Professeur Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004
Professeur Dominique PERROTIN – 2004-2014

PROFESSEURS EMERITES

Professeur Alain AUTRET
Professeur Jean-Claude BESNARD
Professeur Patrick CHOUTET
Professeur Guy GINIES
Professeur Olivier LE FLOCH
Professeur Etienne LEMARIE
Professeur Chantal MAURAGE
Professeur Léandre POURCELOT
Professeur Michel ROBERT
Professeur Jean-Claude ROLLAND

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. Ph. ANTHONIOZ - A. AUDURIER – Ph. BAGROS - G. BALLON – P.BARDOS
J. BARSOTTIA. BENATRE - Ch. BERGER –J. BRIZON - Mme M. BROCHIER - Ph. BURDIN
L. CASTELLANIJ.P. FAUCHIER - B. GRENIER – A. GOUAZE – M. JAN –P. JOBARD
J.-P. LAMAGNERE - F. LAMISSE – J.LANSAC – J. LAUGIER - G. LELORD - G. LEROY
Y. LHUINTE - M. MAILLET - Mlle C. MERCIER - E/H.METMAN – J. MOLINE
Cl. MORAINÉ - H. MOURAY - J.P. MUH - J. MURAT - Mme T. PLANIOL
Ph.RAYNAUD – JC. ROLLAND – Ch. ROSSAZZA - Ph. ROULEAU - A. SAINDELLE
J.J. SANTINI - D.SAUVAGE - M.J. THARANNE – J. THOUVENOT - B. TOUMIEUX - J. WEILL.

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

MM.	ALISON Daniel	Radiologie et Imagerie médicale
	ANDRES Christian	Biochimie et Biologie moléculaire
	ANGOULVANT Denis	Cardiologie
	ARBEILLE Philippe	Biophysique et Médecine nucléaire
	AUPART Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	BABUTY Dominique	Cardiologie
Mme	BARILLOT Isabelle	Cancérologie ; Radiothérapie
M.	BARON Christophe	Immunologie
Mme	BARTHELEMY Catherine	Pédopsychiatrie
MM.	BAULIEU Jean-Louis	Biophysique et Médecine nucléaire
	BERNARD Louis	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
	BEUTTER Patrice	Oto-Rhino-Laryngologie
	BINET Christian	Hématologie ; Transfusion
	BODY Gilles	Gynécologie et Obstétrique
	BONNARD Christian	Chirurgie infantile
	BONNET Pierre	Physiologie
Mme	BONNET-BRILHAULT Frédérique	Physiologie
MM.	BOUGNOUX Philippe	Cancérologie ; Radiothérapie
	BRILHAULT Jean	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	BRUNEREAU Laurent	Radiologie et Imagerie médicale
	BRUYERE Franck	Urologie
	BUCHLER Matthias	Néphrologie
	CALAIS Gilles	Cancérologie ; Radiothérapie
	CAMUS Vincent	Psychiatrie d'adultes
	CHANDENIER Jacques	Parasitologie et Mycologie
	CHANTEPIE Alain	Pédiatrie
	COLOMBAT Philippe	Hématologie ; Transfusion
	CONSTANS Thierry.....	Médecine interne ; Gériatrie et Biologie du vieillissement
	CORCIA Philippe	Neurologie
	COSNAY Pierre.....	Cardiologie
	COTTIER Jean-Philippe	Radiologie et Imagerie médicale
	COUET Charles	Nutrition
	DANQUECHIN DORVAL Etienne	Gastroentérologie ; Hépatologie
	DE LA LANDE DE CALAN Loïc	Chirurgie digestive
	DE TOFFOL Bertrand	Neurologie
	DEQUIN Pierre-François	Thérapeutique ; médecine d'urgence
	DESTRIEUX Christophe	Anatomie
	DIOT Patrice	Pneumologie
	DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague	Anatomie & Cytologie pathologiques
	DUMONT Pascal	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	EL HAGE Wissam	Psychiatrie adultes
	FAUCHIER Laurent	Cardiologie
	FAVARD Luc	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	FOUQUET Bernard	Médecine physique et de Réadaptation
	FRANCOIS Patrick.....	Neurochirurgie
	FROMONT-HANKARD Gaëlle	Anatomie & Cytologie pathologiques
	FUSCIARDI Jacques	Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence
	GAILLARD Philippe	Psychiatrie d'Adultes
	GOGA Dominique	Chirurgie maxillo-faciale et Stomatologie
	GOUDEAU Alain	Bactériologie -Virologie ; Hygiène hospitalière
	GOUPILLE Philippe	Rhumatologie
	GRUEL Yves	Hématologie ; Transfusion
	GUERIF Fabrice	Biologie et Médecine du développement et de la reproduction
	GUILMOT Jean-Louis	Chirurgie vasculaire ; Médecine vasculaire
	GUYETANT Serge	Anatomie et Cytologie pathologiques
	HAILLOT Olivier	Urologie
	HALIMI Jean-Michel	Thérapeutique ; médecine d'urgence (Néphrologie et Immunologie clinique)

	HANKARD Regis	Pédiatrie
	HERAULT Olivier	Hématologie ; transfusion
	HERBRETEAU Denis	Radiologie et Imagerie médicale
Mme	HOMMET Caroline	Médecine interne, Gériatrie et Biologie du vieillissement
MM.	HUTEN Noël	Chirurgie générale
	LABARTHE François	Pédiatrie
	LAFFON Marc	Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence
	LARDY Hubert	Chirurgie infantile
	LASFARGUES Gérard	Médecine et Santé au Travail
	LAURE Boris.....	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
	LEBRANCHU Yvon	Immunologie
	LECOMTE Thierry	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
	LESCANNE Emmanuel	Oto-Rhino-Laryngologie
	LINASSIER Claude	Cancérologie ; Radiothérapie
	LORETTE Gérard.....	Dermato-Vénéréologie
	MACHET Laurent	Dermato-Vénéréologie
	MAILLOT François	Médecine Interne
	MARCHAND-ADAM Sylvain	Pneumologie
	MARRET Henri	Gynécologie et Obstétrique
	MARUANI Annabel	Dermatologie
	MEREGHETTI Laurent	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière
	MORINIERE Sylvain	O.R.L.
	MULLEMAN Denis	Rhumatologie
	PAGES Jean-Christophe	Biochimie et biologie moléculaire
	PAINTAUD Gilles	Pharmacologie fondamentale, Pharmacologie clinique
	PATAT Frédéric	Biophysique et Médecine nucléaire
	PERROTIN Dominique	Réanimation médicale ; médecine d'urgence
	PERROTIN Franck	Gynécologie et Obstétrique
	PISELLA Pierre-Jean	Ophtalmologie
	QUENTIN Roland	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière
	ROBIER Alain	Oto-Rhino-Laryngologie
	ROINGEARD Philippe	Biologie cellulaire
	ROSSET Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	ROYERE Dominique	Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction
	RUSCH Emmanuel	Epidémiologie, Economie de la Santé et Prévention
	SALAME Ephrem	Chirurgie digestive
	SALIBA Elie	Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction
Mme	SANTIAGO-RIBEIRO Maria	Biophysique et Médecine Nucléaire
MM.	SIRINELLI Dominique	Radiologie et Imagerie médicale
	THOMAS-CASTELNAU Pierre	Pédiatrie
Mme	TOUTAIN Annick	Génétique
MM.	VAILLANT Loïc	Dermato-Vénéréologie
	VELUT Stéphane	Anatomie
	WATIER Hervé	Immunologie.

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

Mme LEHR-DRYLEWICZ Anne-Marie Médecine Générale

PROFESSEURS ASSOCIES

MM. HUAS Dominique Médecine Générale
LEBEAU Jean-Pierre Médecine Générale
MALLET Donatien Soins palliatifs
POTIER Alain Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme	ANGOULVANT Theodora	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique : addictologie
M.	BAKHOS David	Physiologie
Mme	BAULIEU Françoise.....	Biophysique et Médecine nucléaire
M.	BERTRAND Philippe	Biostatistiques, Informatique médical et Technologies de Communication
Mme	BLANCHARD Emmanuelle	Biologie cellulaire
	BLASCO Hélène.....	Biochimie et biologie moléculaire
MM.	BOISSINOT Eric	Physiologie
	DESOUBEAUX Guillaume	Parasitologie et mycologie
Mme	DUFOUR Diane	Biophysique et Médecine nucléaire
M.	EHRMANN Stephan	Réanimation médicale
Mme	FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie	Anatomie et Cytologie pathologiques
M.	GATAULT Philippe	Néphrologie
Mmes	GAUDY-GRAFFIN Catherine.....	Bactériologie - Virologie ; Hygiène hospitalière
	GOUILLEUX Valérie	Immunologie
MM.	GYAN Emmanuel	Hématologie, transfusion
	HOARAU Cyrille.....	Immunologie
	HOURIOUX Christophe	Biologie cellulaire
Mmes	LARTIGUE Marie-Frédérique.....	Bactériologie - Virologie ; Hygiène hospitalière
	LE GUELLEC Chantal	Pharmacologie fondamentale ; Pharmacologie clinique
	MACHET Marie-Christine	Anatomie et Cytologie pathologiques
MM.	PIVER Eric	Biochimie et biologie moléculaire
	ROUMY Jérôme	Biophysique et médecine nucléaire in vitro
Mme	SAINT-MARTIN Pauline	Médecine légale et Droit de la santé
MM.	SAMIMI Mahtab	Dermatologie
	TERNANT David	Pharmacologie – toxicologie
Mme	VALENTIN-DOMELIER Anne-Sophie ...	Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière
M.	VOURC'H Patrick	Biochimie et Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFERENCES

Mmes	BOIRON Michèle	Sciences du Médicament
	ESNARD Annick	Biologie cellulaire
M.	LEMOINE Maël	Philosophie
Mme	MONJAUZE Cécile	Sciences du langage - Orthophonie
M.	PATIENT Romuald	Biologie cellulaire

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

Mmes	HUAS Caroline	Médecine Générale
	RENOUX-JACQUET Cécile	Médecine Générale
M.	ROBERT Jean.....	Médecine Générale

CHERCHEURS C.N.R.S. – INSERM

M.	BOUAKAZ Ayache	Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
Mmes	BRUNEAU Nicole	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
	CHALON Sylvie	Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
MM.	COURTY Yves	Chargé de Recherche CNRS – U 618
	GAUDRAY Patrick	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
	GOUILLEUX Fabrice.....	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
Mmes	GOMOT Marie	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
	HEUZE-VOURCH Nathalie	Chargée de Recherche INSERM – U 618
MM.	LAUMONNIER Frédéric	Chargé de Recherche INSERM - UMR CNRS-INSERM 930
	LE PAPE Alain	Directeur de Recherche CNRS – U 618

Mmes MARTINEAU Joëlle Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
 POULIN Ghislaine Chargée de Recherche CNRS – UMR CNRS-INSERM 930

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour la Faculté de Médecine

Mme BIRMELE Béatrice Praticien Hospitalier (*éthique médicale*)
 M. BOULAIN Thierry Praticien Hospitalier (*CSCT*)
 Mme CRINIERE Lise Praticien Hospitalier (*endocrinologie*)
 M. GAROT Denis Praticien Hospitalier (*sémiologie*)
 Mmes MAGNAN Julie Praticien Hospitalier (*sémiologie*)
 MERCIER Emmanuelle Praticien Hospitalier (*CSCT*)

Pour l'Ecole d'Orthophonie

Mme DELORE Claire Orthophoniste
 MM. GOUIN Jean-Marie Praticien Hospitalier
 MONDON Karl Praticien Hospitalier
 Mme PERRIER Danièle Orthophoniste

Pour l'Ecole d'Orthoptie

Mme LALA Emmanuelle Praticien Hospitalier
 M. MAJZOUN Samuel Praticien Hospitalier

REMERCIEMENTS

Je remercie les membres du Jury pour avoir accepté de juger ce travail :

Professeur Gaëlle Fromont-Hankard, vous me faites l'honneur de juger ce travail. Soyez assurée de toute ma reconnaissance.

Professeur Franck Bruyère, mon travail s'inscrit dans la continuité de votre étude menée en 2010. Merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Soyez assuré de mon profond respect.

Docteur Valérie Gouilleux, vous avez collaboré à cette étude, vous avez su me transmettre votre intérêt pour le VEGF. Merci pour vos précieuses explications sur les techniques utilisées dans votre laboratoire, merci pour votre disponibilité.

Docteur Bérangère Narciso, tu m'as transmis ton sens clinique, l'importance de l'anticipation. Tu es un "wonder" médecin capable de gérer tes consultations, la salle, les internes sans aucun souci. Merci de m'avoir permis d'apprendre à tes côtés.

Je remercie mon directeur de thèse :

Professeur Claude Linassier, vous m'accompagnez depuis le début de mon internat, vous m'avez encadré tout au long de ce travail. Merci pour votre soutien, votre disponibilité, vos précieuses explications sur les statistiques. Je suis fière d'avoir appris à vos côtés et de faire partie de votre équipe.

Je remercie toutes les personnes qui ont participé à cette étude. Mille mercis Bettina pour l'inclusion des patients dans l'étude, tes précieux conseils juridiques et surtout ton soutien et ta disponibilité lors de la soumission du projet au CPP.

Je remercie tous les patients ayant accepté de participer à ce travail.

Au-delà de ce travail, je remercie les médecins qui ont marqué mon parcours :

Professeur Philippe Bougnoux, vous m'avez appris " l'art " de la consultation d'oncologie médicale, l'importance du dessin et surtout l'importance de la couleur rouge. Merci pour tous vos conseils, et votre enseignement.

Professeur Donatien Mallet, vous m'avez initiée à la philosophie, à l'intérêt de prendre le temps d'analyser, d'écouter et surtout de réfléchir ensemble. Merci de m'avoir confortée dans ma conviction de l'aspect humaniste de la médecine.

Professeur Stéphane Oudard et l'ensemble de son équipe, vous m'avez accueilli dans votre service avec beaucoup de générosité et simplicité. Merci pour vos précieux conseils et de m'avoir transmis votre intérêt pour la recherche clinique.

Catherine, Erika et Nawale, mes deux stages an hôpital de jour n'auraient pas été pareils sans le tea-time dans votre bureau ou devrais-je dire dans votre serre. Merci pour votre bonne humeur, vos conseils cuisine et surtout merci pour votre écoute.

Docteur Vegas, c'est classe !!! Merci pour ta joie de vivre, tes conseils, ta disponibilité. Fière d'avoir été ton interne et de bientôt partager ton bureau.

Je remercie l'ensemble du service d'oncologie médicale, depuis le rez-de-chaussée au 1^{er} étage. Merci à tous de m'avoir acceptée et intégrée dans votre équipe, ce fût un plaisir de travailler avec vous tous.

Je remercie tous mes co-internes pour tous les bons moments partagés ensemble : Armelle, Claire, Amandine, Aurélie, Najet, Méda, Bruno, Mickaël, François, Julien, Mohamed.

Je remercie tous mes amis :

Mes amies depuis toujours : Pauline, Kro, Aurélie et Julie, que de bons moments passés ensemble à Bignon, les soirées chez les unes et les autres, un fameux voyage en Italie... La distance nous a un peu éloignées mais j'espère qu'on trouvera toujours un moment pour se retrouver toutes ensemble sur Mortagne ou ailleurs.

La bande des Uches : Duche, Cluche, Dédé, Tietienne et Levert. Ce surnom a pris naissance en P2, depuis ce groupe s'est pas mal modifié et des « non-uches » se sont intégrés. Merci les amis d'être vous, d'être toujours là dans les bons et moins bons moments. Merci pour tout et « VIVE MENTON ».

Mes amis rencontrés à Orléans et Tours: Jeanne et Philippe, Marine et Bertrand, Sabine, Edouard, Plantoche, Pauline et Joseph, Charlotte et Youenn, Laura et Benco, Margaux et

Rodolphe, Agnès et Benoit, Caro le bitchon, Claire et Geoffroy, Pierre, Charles et Clémence. Merci pour tous ces apéros improvisés au strap', place plum', au Saint Germain, à l'apart.... Vous êtes ma petite famille tourangelle, merci pour tous ces bons moments passés et tous ceux à venir.

Les amis d'Edouard qui sont devenus également mes amis : Coline et Mitchou, Clément, Delphine, Arnaud, Lucie et JB, Sabrina et Thomas, So et Fab, Manu, Jeanjean. Merci pour l'initiation à l'art du jeu (surtout le vrai Uno hostile et le canardage !!!), les soirées jusqu'à pas d'heure, les vacances et weekend entre copains.

Je remercie la famille Cottereau : Catherine et Vincent, Marine Paul et Henri, Charlotte Claude Victoire et Martin, Etienne. Merci de m'avoir accueilli dans votre famille avec sincérité et gentillesse. Merci de nous soutenir avec Edouard dans les différentes étapes de notre carrière et surtout de notre vie.

Je remercie Mireille pour juste être toi. Tant de souvenirs depuis que j'ai 4/5 ans entre les vacances aux Aspres avec tous les cousins (Soligny la plage, atelier devoirs de vacances, une histoire de tondeuse...) aux étapes un peu plus sérieuses : bac, médecine. Tu fais partie de la famille avec ses bons et moins bons côtés. Merci d'être toujours mais vraiment toujours là, merci pour ton écoute, ton intelligence et tes précieux conseils.

Je remercie toute ma famille depuis le Cambodge jusqu'en Normandie. Une pensée particulière pour les sages de cette famille : Mamie Sou et Mamie Christiane. J'espère que de là où vous êtes, vous êtes fières de nous tous. Je pense souvent à vous et je sais que vous veillez sur nous. Surtout n'arrêtez pas, on a besoin de vous. MERCI

Merci Emmanuelle, ma sœur. Que dire : merci pour ton soutien, tes avis, tes conseils tout au long de ma vie. Merci pour être toujours là pour moi, eh oui je suis une personnalité dépendante!!

Merci Papa, Merci Maman. Merci de m'avoir transmis cet exotisme qui règne en permanence à la maison, cette ouverture d'esprit et la tolérance de l'autre. Et surtout merci de nous avoir transmis avec Emmanuelle l'importance de la Famille. Au-delà de cette thèse et de mes études je vous remercie juste pour être vous Papa et Maman. Je vous aime.

Et enfin, je remercie l'homme qui me soutient et me supporte au quotidien. Edouard, mon Cotcot, merci de ta confiance, de ta générosité, de ta sincérité, de ta joie de vivre, de l'amour que tu me donnes au quotidien. A nous et pour toujours, je t'aime.

SOMMAIRE

I.	INTRODUCTION	14
A.	Epidémiologie	14
B.	Diagnostic	14
C.	Histologie.....	15
D.	Facteurs pronostiques.....	16
1.	Au stade localisé	16
2.	Au stade métastatique	17
E.	Prise en charge des tumeurs rénales à cellules claires	19
1.	Stade localisé	19
2.	Formes métastatiques	19
F.	Importance de l'angiogénèse dans le cancer du rein à cellules claires	22
1.	Voie VHL-HIF α	22
2.	La famille des VEGF.....	23
II.	OBJECTIFS DE L'ETUDE	27
III.	MATERIELS ET METHODES.....	28
A.	Schéma de l'étude.....	28
B.	Critères d'inclusion.....	29
C.	Analyse des polymorphismes.....	29
D.	Analyse statistique	30
IV.	RESULTATS	33
A.	Caractéristiques de la population	33
B.	Répartition des polymorphismes	33
C.	Analyse de survie univariée.....	35
1.	Survie globale	35
2.	Survie globale métastatique	38
3.	Survie sans métastase	40
4.	Survie sans progression 1 ^{ère} ligne métastatique	41
D.	Analyse de survie multivariée	43
1.	Survie globale	43
2.	Survie globale métastatique.....	43

3. Survie sans progression 1 ^{ère} ligne de traitement	44
V. DISCUSSION.....	45
A. Rôle pronostique des polymorphismes du VEGF	46
B. Rôle prédictif de réponse des polymorphismes du VEGF	47
C. Mécanismes possibles impliquant les SNPs dans la réponse aux traitements et dans le pronostique tumoral.....	48
D. Points forts de notre étude	48
E. Points faibles de notre travail	49
VI. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	50
VII. BIBLIOGRAPHIE	51
VIII. ANNEXES	55

LISTE DES ABREVIATIONS

3' UTR:	3' UnTranslated Region
5' UTR:	5' UnTranslated Region
AMM:	Autorisation de Mise sur le Marché
AKT:	Protéine kinase B
ECOG:	Eastern Cooperative Oncology Group
HIF:	Hypoxia Inducible Factor
IL2:	Interleukin 2
INF α :	Interferon α
MAP kinases:	Mitogene activated protein kinase
mTOR:	Mammalian Target Of Rapamycin
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PDGF:	Platelet Derived Growth Factor
PI3K:	Phosphatidylinositol 3-kinase
RAF:	Rat Fibrosarcoma virus
RAS:	Rat Sarcoma
RECIST:	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphism
SNP:	Single Nucleotide Polymorphism
SSIGN:	Stage Size Grade Necrosis
TDM:	Tomodensitométrie
TNM:	Tumor Node Metastase
TGF:	Tumor Growth Factor
TKI:	Tyrosine Kinase Inhibitor
UISS:	Ucla Integrated Staging System
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R:	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VHL:	Von Hippel Lindau

I. INTRODUCTION

A. Epidémiologie

Le cancer du rein représente 2 à 3% des tumeurs malignes de l'adulte. Il s'agit du troisième cancer urologique le plus fréquent après le cancer de la prostate et le cancer de la vessie. Avec 11 573 nouveaux cas estimés en France, le cancer du rein se situe au 7^{ème} rang des tumeurs solides. Le taux d'incidence standardisé est de 14,5/100 000 chez l'homme et de 5,8/100 000 chez la femme en 2012. Ce taux est en constante augmentation depuis 30 ans dans tous les pays industrialisés. Le cancer du rein est responsable de 3 900 décès par an en France. L'âge moyen de survenue est de 62 ans et plus de 80% des patients ont plus de 50 ans au diagnostic. Le sexe ratio est de 2,1/1 (1). Dans 70 à 80 % des cas, il s'agit de tumeurs à cellules claires hypervascularisées en lien avec une inactivation du gène suppresseur de tumeur le Von Hippel Lindau (VHL) induisant une activation du système du VEGF.

B. Diagnostic

En dehors de syndromes familiaux tels que la maladie de Von Hippel Lindau, les principaux facteurs de risques reconnus du carcinome à cellules claires sont le tabac, l'obésité et l'hypertension artérielle. Les autres facteurs connus sont l'exposition aux dérivés du pétrole, des métaux lourds et le diabète. (2)

Les cancers du rein sont le plus souvent de découverte fortuite (45%) sur une imagerie rénale. D'autres diagnostics sont portés sur des signes loco-régionaux (hématurie, douleur ou masse lombaire) (45 %) ou généraux (fièvre) (10 %). La triade classique associant hématurie, douleur lombaire et masse lombaire n'est retrouvée que dans 10 % des cas.(3)

L'imagerie en complément de l'histoire clinique du patient permet de faire le diagnostic probabiliste de la majorité des tumeurs rénales. Le TDM abdominal est l'examen de référence. Dans le cadre du carcinome à cellules claires, typiquement, il retrouve une nécrose excentrique associée à des remaniements hémorragiques avec un rehaussement précoce et intense de la portion solide. Il permet également d'évaluer l'envahissement locorégional et veineux. Une biopsie percutanée n'est utile que si elle permet d'optimiser la prise en charge thérapeutique d'une tumeur rénale. Elle est indiquée dans le cadre d'un cancer du rein non extirpable (4) (maladie métastatique ou localement avancée), d'une

maladie où il est envisagé un traitement ablatif (5), chez un patient présentant des comorbidités notables (6) et dans un contexte de cancer extra rénal connu (7).

C. Histologie

L'Organisation Mondiale de la Santé a proposé en 2004 une classification des tumeurs rénales basées sur des critères histologiques et cytogénétiques (8), sont alors décrits 49 sous-types de tumeurs rénales. Une conférence de consensus a eu lieu en mars 2012, elle a permis de mettre en évidence cinq nouvelles entités ainsi que des entités émergentes (9). Les principales tumeurs du rein de l'adulte sont représentées par les tumeurs malignes à cellules rénales et parmi lesquelles les tumeurs à cellules claires hypervascularisées. Plus rarement il s'agit de tumeur papillaire (10 à 20%) ou de tumeur chromophile (5%).

Le carcinome à cellules claires est typiquement, en macroscopie, une tumeur bien limitée (pseudo capsule), de couleur jaunâtre avec des territoires blanchâtres (haut grade). Il existe de nombreux remaniements kystiques, hémorragiques et nécrotiques avec présence de calcifications ou d'ossifications. Selon sa taille et son siège, la tumeur peut atteindre la capsule rénale, voire envahir la graisse péri rénale. La tumeur peut s'étendre dans la veine rénale, plus rarement dans la veine cave inférieure. Histologiquement, il s'agit d'un adénocarcinome constitué d'une prolifération acineuse de cellules au cytoplasme clair. La cellule claire qui constitue la prolifération est de grande taille, de forme polygonale, avec un noyau central et un cytoplasme chargé de glycogène et de lipides (figure 1). La plupart des carcinomes à cellules claires sont composés de plusieurs types cellulaires : cellules claires, éosinophiles voire fusiformes. Les carcinomes à cellules claires sont désignés par le contingent le plus représenté.

Un tiers des patients est diagnostiqué d'emblée au stade métastatique, et, parmi les patients présentant une forme localisée, environ 30% vont développer des métastases.(10)

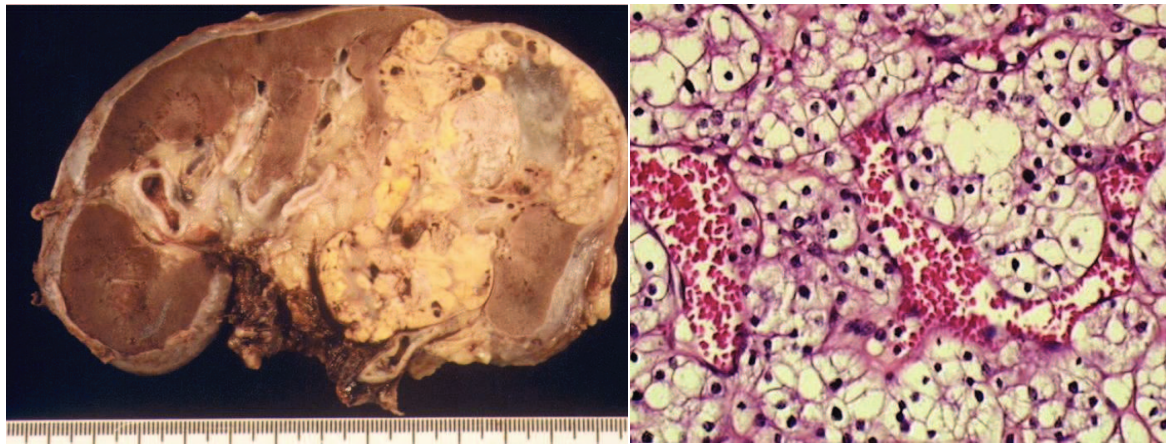


Figure 1 : Examen macroscopique et microscopique d'un carcinome à cellules claires (G. Fromont, CHU Bretonneau, service d'anatomopathologie)

D. Facteurs pronostiques

1. Au stade localisé

❖ Le modèle UISS (UCLA Integretad Staging System) décrit à partir de l'analyse de 661 patients, présentant un cancer du rein tout type histologique confondu, ayant subi un traitement radical en 2001, classe les patients en 3 groupes selon 3 variables (11):

- Stade T
- Grade de Fuhrman
- ECOG ou Karnofsky

STADE T GRADE de FUHRMAN ECOG RISQUE	1				2 ↓	3				4 ↓
	1-2		3-4			1		> 1		
	0	≥ 1	0	≥ 1		0	≥ 1	0	≥ 1	
	BAS		INTERMEDIAIRE				HAUT			

Tableau 1 : Système UISS détermine 3 groupes dans le cancer du rein localisé (Zisman et al, 2001)

❖ Le modèle SSIGN (Stage, Size, Grade and Necrosis) a été mis au point uniquement pour les variétés histologiques à cellules claires (12). Il s'agit également d'un modèle post-opératoire qui inclut des variables anatomiques et histologiques. Les variables prises en compte sont : stade TNM, le grade du Fuhrman, la nécrose tumorale et la taille tumorale.

2. Au stade métastatique

❖ En 2002 Motzer *et al.* appliquent un modèle pronostique à 463 patients candidats à une première ligne de traitement systémique (13). Ces traitements sont tous à base d'interféron α . Les patients sont classés en fonction de cinq variables :

- Indice de Karnofsky (péjoratif si <80%)
- Valeur de LDH (péjoratif si >1,5 fois la normale)
- Taux d'hémoglobine (péjoratif si <13g/dl homme / <11,5g/dl femme)
- Calcémie corrigée (péjoratif si >10mg/dl)
- Durée de l'intervalle entre le diagnostic de cancer du rein et celui du début de traitement systémique (péjoratif si <1an)

Le pronostic des patients était distingué en bon, intermédiaire ou mauvais selon qu'ils n'aient aucun, un ou plus d'un facteur péjoratif. (Tableau 2)

	Bon pronostic	Pronostic intermédiaire	Mauvais pronostic
Nombre de facteurs	0 facteur	1-2 facteurs	>2 facteurs
Survie médiane (mois)	30	14	5

Tableau 2 : Survie médiane selon le score pronostique de Motzer (Motzer *et al.*, 2002)

❖ Une étude du groupe français d'immunothérapie en 2002 (14), établit également un score pronostique à partir de l'analyse de 782 patients présentant un cancer du rein métastatique traité par des cytokines.

Trois groupes sont alors identifiés à partir de l'analyse de cinq variables :

- L'état général
- Intervalle entre la découverte du cancer primitif et celle des métastases (péjoratif si <1an)
- Nombre de sites métastatiques (péjoratif si >1)
- Présence de métastases hépatiques
- Signes biologiques d'inflammation (neutrophiles élevés et Hb <10g/dl)

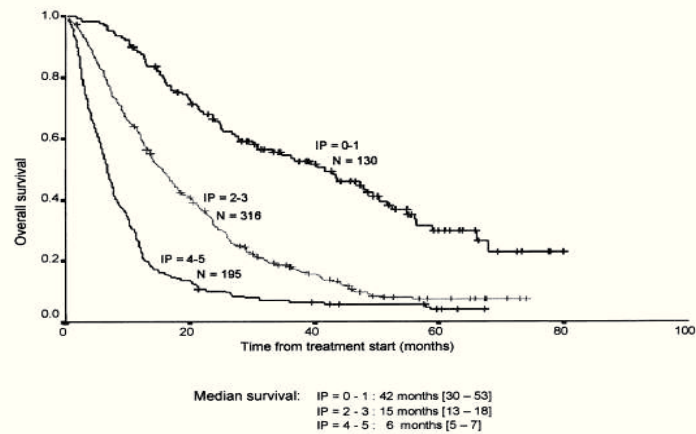


Figure 2 : Survie globale estimée en fonction de la présence de un, deux ou trois, quatre ou cinq facteurs pronostiques (Négrier et al, 2002)

❖ Récemment, d'après l'analyse de 645 patients, Heng *et al.* (15) a établi un nouveau score pronostique chez les patients présentant un cancer du rein métastatique traités par anti-angiogéniques. Ainsi les patients sont classés en 3 groupes selon 6 variables.

- Taux d'hémoglobine < N
- Calcémie > N
- Indice de Karnofsky < 80%
- Polynucléaires neutrophiles > N
- Plaquettes > N
- Durée entre diagnostic et début des traitements < 1an

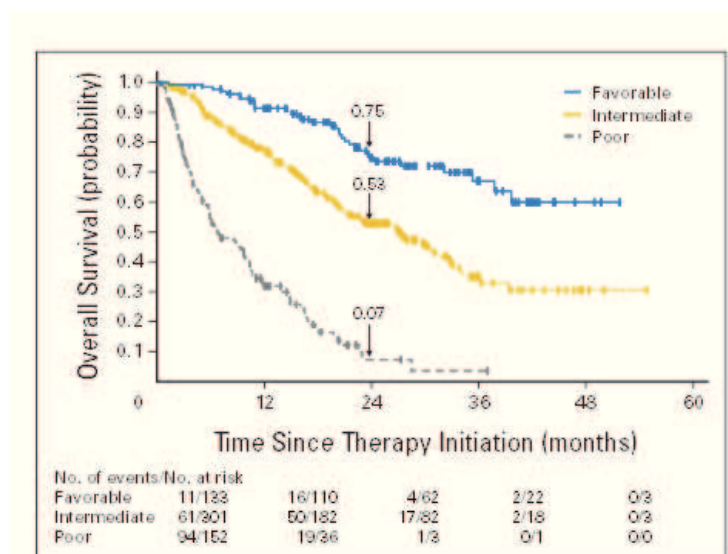


Figure 3 : Survie globale estimée à partir des 3 groupes de risque (Heng et al, 2013).

E. Prise en charge des tumeurs rénales à cellules claires

1. Stade localisé

Le traitement chirurgical reste la référence avec deux possibilités (16) : néphrectomie totale élargie ou néphrectomie partielle, le choix dépendant de la taille de la tumeur. Habituellement les tumeurs de moins de 4 cm peuvent être traitées par chirurgie partielle (tumorectomie, wedge, polaire). A l'inverse une néphrectomie élargie est réalisée pour les tumeurs de plus de 7 cm. La chirurgie ouverte est la technique de référence de la néphrectomie partielle. L'abord laparoscopique est une alternative à la chirurgie ouverte qui peut être réalisée par des équipes entraînées et chez des patients sélectionnés. Le taux de complications péri-opératoires est supérieur en chirurgie laparoscopique par rapport à la chirurgie ouverte. Ce taux diminue avec l'expérience de l'opérateur, le caractère exophytique de la tumeur et sa taille limitée.

Concernant le traitement adjuvant et néo-adjuvant, aucun n'a fait preuve d'efficacité. De nombreux essais cliniques sont en cours, l'inclusion des patients dans ces essais doit être encouragée.

2. Formes métastatiques

Le cancer du rein métastatique est chimiorésistant. Jusqu'à 2005, le traitement standard est l'immunothérapie avec l'utilisation de deux cytokines l'interleukine 2 (IL 2) et l'interféron α (IFN α). La survie globale médiane est alors de 8 à 10 mois et le taux de survie à 5 ans est inférieur à 10%.

Depuis 2006, l'intérêt des thérapies moléculaires ciblées a été démontré, modifiant les stratégies thérapeutiques. Le bevacizumab (Avastin®) est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF-A. Deux études de phase III, comparant l'association bevacizumab et interféron α à l'interféron α et placebo, ont confirmé l'efficacité du bevacizumab. Dans l'étude européenne (17), la survie sans progression est de 10,2 *versus* 5,4 mois dans le bras bevacizumab et interféron α et le taux de réponse passe de 13 à 31%. Les inhibiteurs de tyrosine kinase agissent essentiellement sur le récepteur du VEGF. Un essai de phase III évaluant le sorafenib contre placebo (18) a été réalisé chez 905 patients, trouvant un avantage en survie sans progression de 12 semaines en deuxième ligne métastatique. Le

sunitinib est administré par voie orale à la dose de 50 mg/jour 4 semaines sur 6. Une étude de phase III comparant chez 750 patients l'interféron α au sunitinib en 1^{ère} ligne métastatique a montré un avantage en survie sans progression de 23 semaines et 6 fois plus de réponse partielle (19). Un autre inhibiteur de tyrosine kinase, le pazopanib à la posologie de 800 mg/jour en 1^{ère} ligne métastatique a montré un bénéfice en survie sans progression de 9,2 mois *versus* 4,2 mois dans le groupe placebo (20). Récemment l'axitinib a été testé en deuxième ligne de traitement à la posologie initiale de 5mg 2 fois par jour, contre le sorafenib chez 723 patients. La survie sans progression était augmentée de 2 mois dans le bras axitinib avec une toxicité moindre (21). Depuis janvier 2013, l'axitinib a une AMM en 2^{ème} ligne après traitement par sunitib ou cytokines.

Les inhibiteurs de mTOR ont un effet anti angiogénique, anti prolifératif et pro apoptotique en inhibant la voie PI3kinase/AKT (22). Le temsirolimus administré en IV 25mg/semaine a été étudié dans un essai de phase III chez 626 patients de mauvais pronostic en 1^{ère} ligne métastatique. Il a été montré un doublement de la survie sans progression à 3,8 mois *versus* 1,9 mois chez les patients traités par interféron α seul (23). L'everolimus administré par voie orale à la dose de 10 mg par jour a été évalué chez des patients en échec de sorafenib et/ou de sunitinib. Dans une étude de phase III contre placebo, la survie sans progression est supérieure à 4 mois (24).

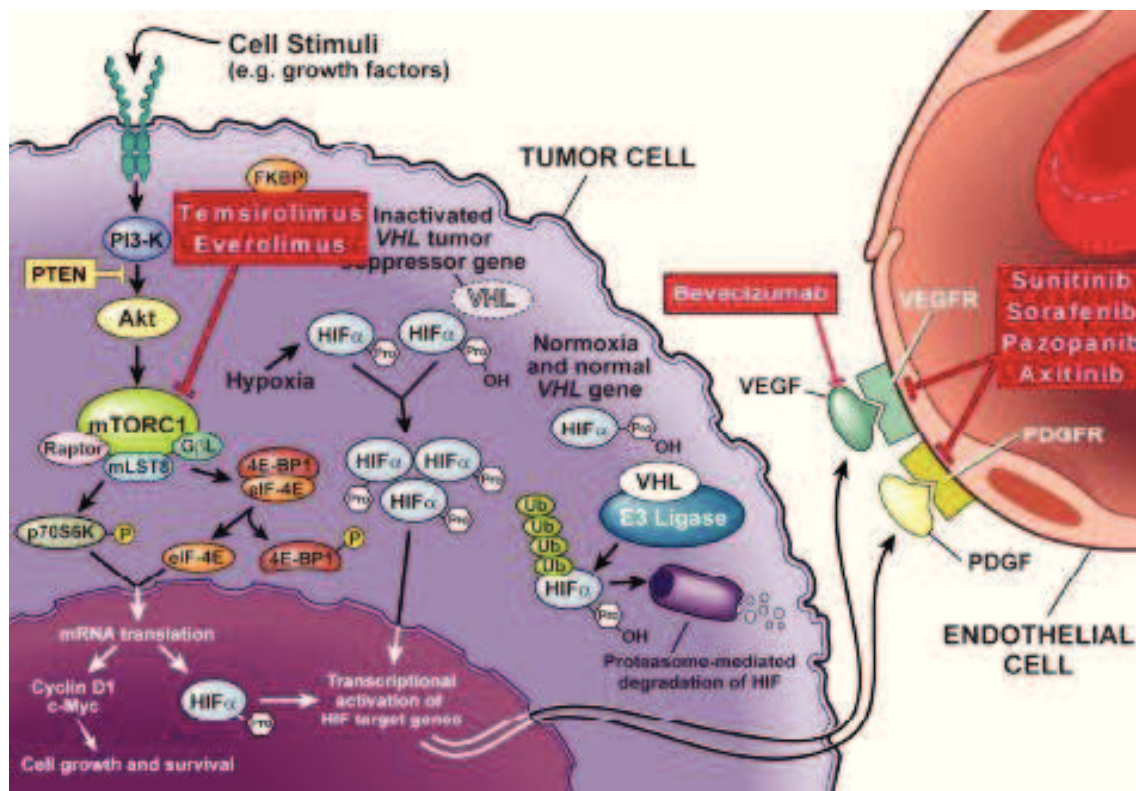


Figure 4 : voies de signalisation et mécanismes d'action des différentes thérapeutiques(A.R.Tu.R.Rein.org)

Le choix entre ces différentes molécules se fait selon le groupe pronostique initialement établi par Motzer.

histologie et ligne	groupe pronostique	standard	option
cellules claires 1ère ligne	pronostic bon ou intermédiaire	sunitinib, bevacizumab + INF pazopanib	cytokines
	mauvais pronostic	temsirolimus	sunitinib sorafenib
cellules claires 2ème ligne	post cytokines	sorafenib, pazopanib	sunitinib sorafenib
	post TKIs	axitinib everolimus, axitinib	sorafenib
non à cellules claires			temsirolimus sunitinib sorafenib

Tableau 3 : Recommandations de l'ESMO pour le traitement médical du cancer du rein métastatique (Escudier et al. 2012)

F. Importance de l'angiogénèse dans le cancer du rein à cellules claires

1. Voie VHL-HIF α

La physiopathologie du carcinome rénal est bien connue grâce à l'analyse de la maladie de Von Hippel Lindau. Le cancer du rein à cellules claires est une tumeur hypervascularisée avec une angiogénèse importante (25). Une des mutations précoces identifiées dans son développement concerne le gène suppresseur de tumeur Von Hippel-Lindau (VHL). Ce gène est doublement inactivé dans la maladie de Von Hippel Lindau. Cette double mutation est également retrouvée dans 60 à 80% des formes sporadiques de cancer du rein (26). Le complexe VHL a pour principale fonction la régulation de facteurs de transcription appelés HIF α (Hypoxia inducible factor). La régulation de la sous-unité α de HIF par le complexe VHL est médiée par un complexe multienzymatique protéique. Ce complexe, en présence d'oxygène qui est nécessaire à une hydroxylation préalable de HIF, induit la poly-ubiquitinylation de HIF α qui est alors dégradé par le protéasome. En situation d'hypoxie ou lorsqu'il existe une inactivation du gène VHL (double mutation inactivatrice), HIF α non hydroxylé, n'est pas détruit par le protéasome, il s'hétérodimérise dans le noyau avec la sous-unité β de HIF présente en excès, agissant alors comme facteur de transcription. Ce complexe HIF α et β induit une séquence de transcription de plusieurs dizaines de gènes impliqués dans l'angiogénèse et la prolifération cellulaire comme en situation d'hypoxie (27). (Figure 5) Parmi ces gènes, il existe le vascular endothelial growth factor (VEGF), le platelet derived growth factor (PDGF) ou encore le transforming growth factor (TGF α). Ont une importance particulière pour la physiopathologie de la maladie, le VEGF A qui se lie à un des différents isomères du récepteur au VEGF est l'élément clé de l'angiogénèse en induisant la migration des cellules endothéliales, leur prolifération et leur survie. Le PDGF favorise l'angiogénèse par son action sur les péricytes. Le TGF α se lie au récepteur de l'epidermal growth factor (EGF-R) et favorise la prolifération, la survie, la différenciation et la migration cellulaire. Les voies de transduction du signal liées à ces récepteurs sont la voie PI3kinase/AKT/mTOR et la voie Ras/Raf/MAPkinase qui jouent un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire, de l'apoptose ou de l'angiogénèse.

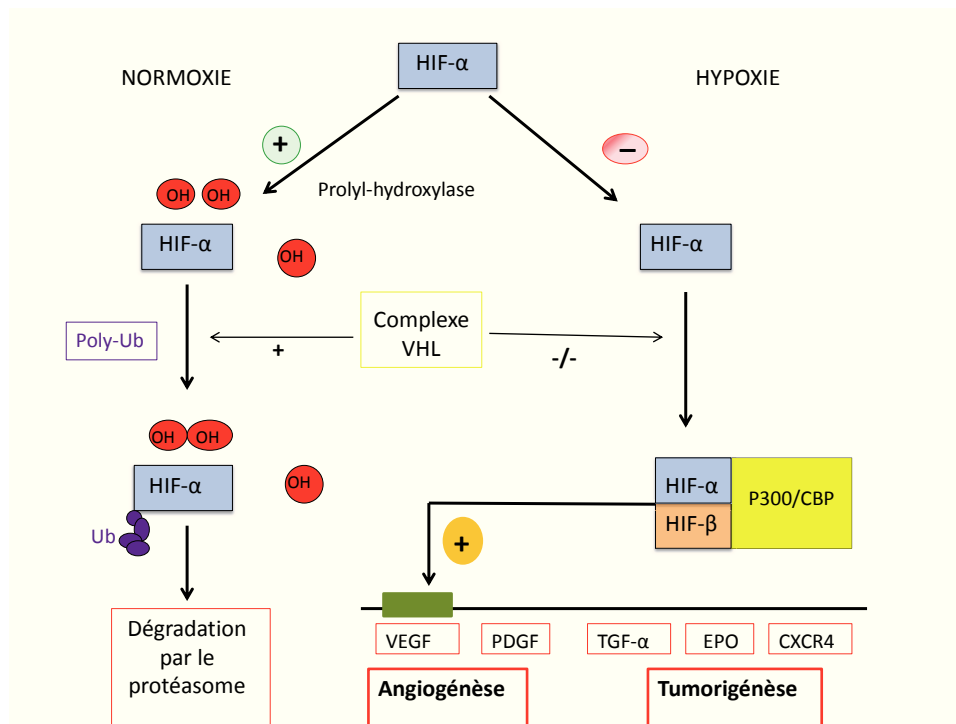


Figure 5: Schéma du système VHL/HIF α . En cas de mutation inactivatrice de VHL, HIF α s'accumule et stimule l'angiogénèse, la tumorigénèse de manière permanente.

2. La famille des VEGF

Les protéines de la famille des VEGF sont au nombre de six : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et le Placenta Growth Factor (PlGF). La réponse au VEGF se fait principalement par l'activation de ses récepteurs, le VEGF-R1, VEGF-R2 et VEGF-R3 (25). L'activation de ces récepteurs présents sur les cellules endothéliales sanguines permet l'angiogénèse, par prolifération et migration cellulaire. Le VEGF-R1 et VEGF-R2 sont exprimés sur la plupart des cellules sanguines. Le VEGF-R2 est le récepteur principal du VEGF-A qui a un rôle important dans l'angiogénèse sanguine. Le VEGF-R3 est principalement présent sur les cellules lymphatiques et interagit avec le VEGF-C qui intervient essentiellement dans la lymphangiogénèse et donc la prolifération tumorale ganglionnaire. Le VEGF-B joue un rôle dans la vascularisation de la musculature striée et dans le développement de la moelle mais ne semble pas indispensable à l'angiogénèse chez l'adulte.

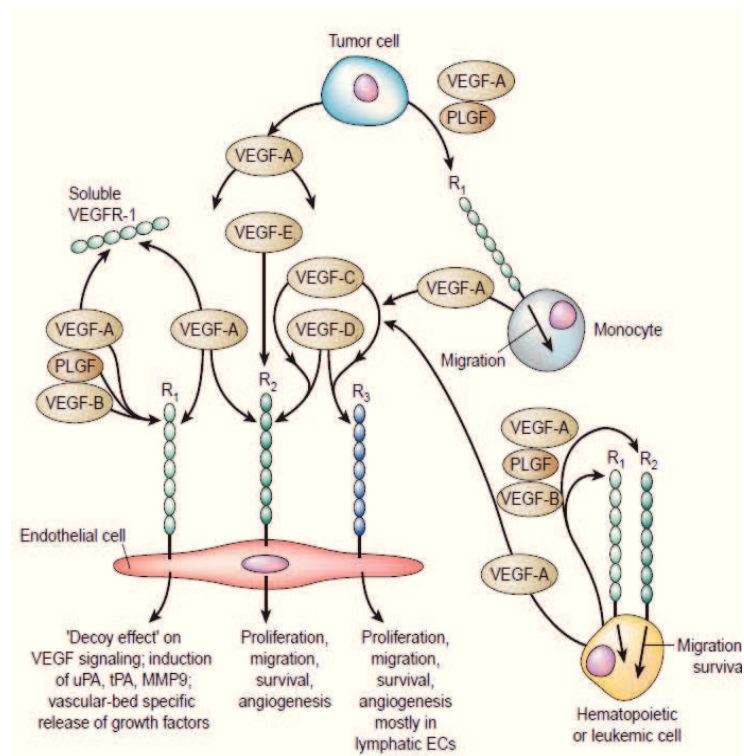


Figure 6: Rôle des récepteurs au VEGF sur les différents types cellulaires (Ferrara, 2003).

Chez l'homme, le gène VEGF-A est localisé sur le chromosome 6p21.3. Il est constitué de 8 exons et 7 introns (28).

L'expression de ce gène conduit à la synthèse de plusieurs isoformes dont la taille varie entre 121 et 206 acides aminés. Ils sont issus d'un épissage alternatif des exons 6, 7 et 8 et possèdent des propriétés physiologiques différentes. Les sites de dimérisation et les sites de liaison aux récepteurs VEGFR1 (encodé par l'exon 3) et VEGFR2 (encodé par exon 4), sont des séquences présentes dans tous les isoformes. Les sites de liaison à l'héparine (encodé par exon 6 et 7) et les derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale peuvent varier en fonction de l'isoforme. (Figure 7)

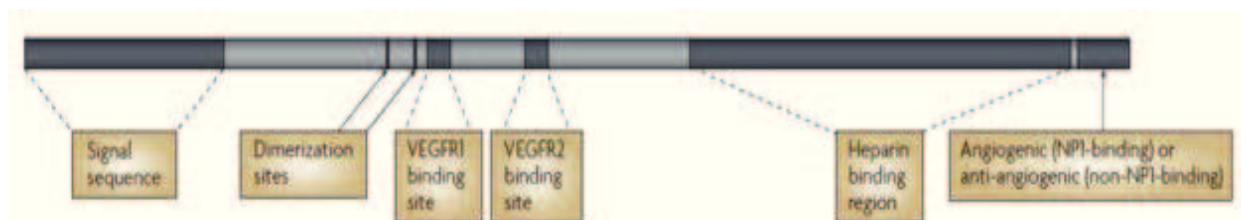


Figure 7: Représentation schématique des domaines fonctionnels de la protéine VEG (Harper SJ, 2008).

Le VEGF-165 est l'isoforme majoritaire. Il a récemment été découvert que l'épissage alternatif de l'ARNm du VEGFA était à l'origine de deux familles de protéines, se différenciant par leur extrémité C-terminale, qui se nomment VEGF-Axxx (ayant un rôle pro-angiogénique) et VEGF-Axxx_b (ayant un rôle anti-angiogénique) (xxx signifiant le nombre d'acides aminés de la protéine mature) (28)

En situation physiologique, les isoformes Axxx_b sont les formes prédominantes, alors qu'en situation de cancer du rein les isoformes Axxx prédominent. Il existe un « switch » de la balance anti- vers pro-angiogénique, avec augmentation de l'expression des formes Axxx aux dépens des formes Axxx_b. (29)

Une augmentation de la production de VEGF a été observée chez des patients porteurs de tumeurs rénales avec des altérations du gène VHL et pour des grades tumoraux avancés.(30)

❖ Le polymorphisme de nucléotide simple (SNP) résulte de la modification d'un seul nucléotide dans un gène sans conséquence clinique ou pathologique. Parfois, ce SNP peut être responsable d'une insertion ou d'une délétion de nucléotide. Il est responsable de différentes variantes de ce gène. Une cinquantaine de SNPs ont été décrit pour le gène du VEGF. Parmi ces SNPs certains ont une fréquence élevée dans la population générale et ont été analysé dans diverses pathologies tumorales (31-33). Cinq SNPs sont particulièrement décrits -2549 I/D, -1154 G/A, -460 T/C dans la région promotrice du VEGF, +405 G/C dans la région non transcrite 5' et +936 C/T dans la région non transcrite 3'. (Figure 8)

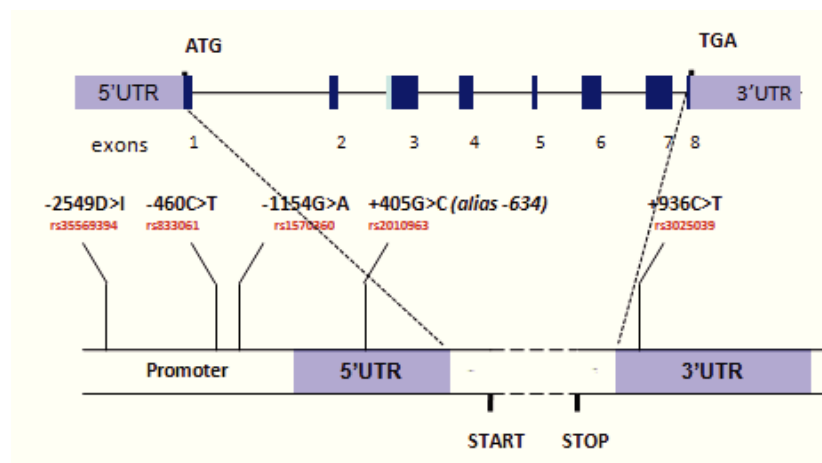


Figure 8 : Localisation des différents polymorphismes sur le gène du VEGF.
NB : La numérotation n'est pas standardisée et varie selon les publications

Certains de ces SNPs ont été décrits comme des facteurs de risques de survenue de pathologie tumorale ou non en influant sur l'angiogénèse. Certaines études ont établi un lien entre les polymorphismes du VEGF et les complications microvasculaires du diabète notamment la néphropathie et rétinopathie diabétique.(34, 35)

Récemment de nombreuses études ont suggéré un possible lien entre des variations génétiques de la voie de l'angiogénèse et l'évolution globale de certains cancers. Ainsi, en 2010 Hansen *et al.* (32) ont analysé l'évolution de 72 cancers colo rectaux métastatiques traités par Xelox en première ligne. Certains génotypes du VEGF notamment le -2578 A/A et C/C ; -460 C/C et T/T ; -405 G/G et C/C sont associés à un taux de réponse augmenté.

En 2008, Schneider *et al.* (33) ont examiné la relation entre différents SNPs du VEGF et l'efficacité du traitement par paclitaxel + bevacizumab chez 363 patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique. Les résultats ont montré un lien entre le génotype -2578 A/A du VEGFA, la présence de l'allèle A au niveau -1154 et une survie globale améliorée chez les patientes recevant la bithérapie.

Des facteurs de risque de survenue du cancer du rein ont été récemment mis en évidence, notamment au niveau génétique. Ainsi Bruyère *et al.* en 2010 ont analysé 5 polymorphismes du VEGF chez 202 individus contrôles et 51 patients présentant un cancer du rein (36). Il était alors mis en évidence que la présence du polymorphisme -460 C/T semblait être associé à un risque élevé de survenue du cancer du rein. De même en 2007 Kawai *et al.* (37) retrouvaient une association entre le polymorphisme -1154G/A et une tumeur de plus petite taille avec un stade tumorale moins important. Le polymorphisme -2578C/A semblait également associé à une invasion lymphatique moindre et une survie spécifique augmentée. Kim *et al.* (38) en 2012 ont montré une association significative entre le SNP -634 G/G et le développement d'une hypertension artérielle sous traitement par sunitinib.

❖ Nous avons repris la population étudiée dans l'étude du CHU de Tours de F. Bruyère analysant cinq polymorphismes du VEGF chez 253 patients en tant que facteur de risque de survenue de carcinome rénal. Etaient inclus 202 individus contrôles et 51 patients présentant un carcinome rénal. Nous avons actualisé notre population en sélectionnant les patients qui ont développé une maladie métastatique et pour laquelle un traitement anti angiogénique a été instauré. Une étude préliminaire a été effectuée chez ces 37 patients sélectionnés. Le polymorphisme +936C/T semblait avoir un rôle pronostique et influencer

essentiellement la phase métastatique de la maladie. La survie globale métastatique était augmentée de manière significative chez les patients porteurs du SNP +936 C/C (médiane 46 mois vs 22 mois $p = 0,006$). Le polymorphisme +936 conservait une valeur pronostique indépendante en analyse multivariée. On retrouvait une tendance d'augmentation de la survie sans progression en 1^{ère} ligne métastatique chez les patients porteurs du SNP +936 C/C vs +936 C/T (médiane 17 mois vs 8 mois $p = 0,12$) mais non statistiquement significative.

II. OBJECTIFS DE L'ETUDE

On manque actuellement de biomarqueurs pronostiques ou prédictifs. La survenue d'une hypertension artérielle, d'une protéinurie ou d'une toxicité cutanée joue un rôle prédictif dans le carcinome à cellules claires traité par anti-angiogéniques (39, 40). Notre travail consiste donc à déterminer sur une cohorte confirmatoire si certains polymorphismes du VEGF sont des facteurs pronostiques dans le cancer du rein à cellules claires métastatique et s'ils influent sur la réponse aux différents traitements anti-angiogéniques.

III. MATERIELS ET METHODES

A. Schéma de l'étude

Ce travail a été mené au CHU de Tours. Les échantillons d'ADN étaient obtenus à partir de prélèvement sanguin veineux après recueil du consentement éclairé du patient. A l'occasion d'un bilan sanguin en consultation ou en hospitalisation, était prélevé un tube supplémentaire (tube EDTA) pour l'analyse des polymorphismes du VEGF. Le consentement de la personne était recueilli par écrit préalablement à la réalisation de l'examen, après qu'elle ait été dûment informée de sa nature et de sa finalité. Le consentement mentionnait la finalité de l'examen. Le patient pouvait bénéficier d'un délai de réflexion de trois semaines. Le protocole a reçu un avis favorable du Comité de Protection des Personnes de la région Centre.

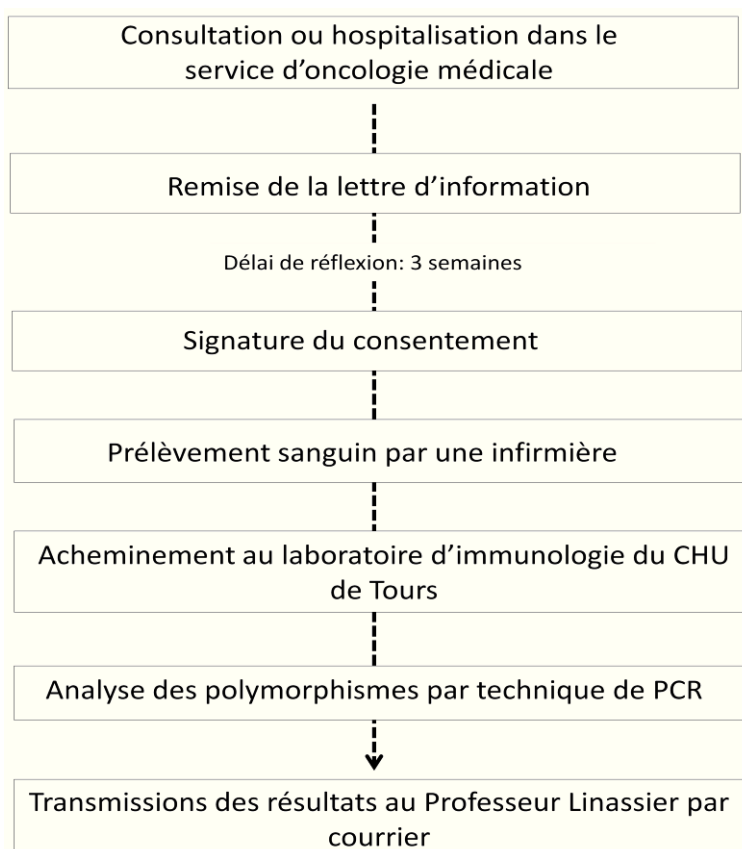


Figure 9 : Synthèse des différentes étapes de l'étude.

B. Critères d'inclusion

Les critères d'inclusion étaient :

- histologie de carcinome à cellules claires (confirmée par néphrectomie ou biopsie de rein ou métastase)
- maladie métastatique
- traitée par anti-angiogénique de type bevacizumab, sunitinib, everolimus, temsirolimus, sorafénib, axitinib, ou pazopanib
- homme ou femme ≥ 18 ans

N'étaient pas inclus, les patients traités par immunothérapie seule, les histologies papillaire ou composante sarcomateuse et les patients mineurs.

C. Analyse des polymorphismes

L'analyse biologique était réalisée au sein du laboratoire d'immunologie du CHU de Bretonneau, par Valérie Gouilleux.

Cinq polymorphismes du VEGF ont été étudiés -2549 D/I (rs35569394), -460C/T (rs833061), -1154G/A (rs1570360), +405G/C –rs2010963) et +936C/T (rs3025039). Ces polymorphismes sont fréquents dans la population générale, ils ont démontré un intérêt dans diverses pathologies tumorales et ont un lien avec la production de VEGF (31-33, 41). Ces différents polymorphismes ont été analysés par deux techniques de PCR. La PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) suppose que le polymorphisme modifie les sites de restrictions et génère des fragments d'ADN différents en nombre et en taille. L'autre technique est la PCR multiplex qui est l'amplification simultanée de plusieurs séquences cibles dans un même tube d'amplification, il existe alors une compétition d'affinité pour les amorces qui varie selon le polymorphisme

Le SNP +936 était analysé par technique de RFLP. Il s'agissait d'une PCR suivie d'une digestion enzymatique et d'une électrophorèse permettant en présence de témoins, de définir la présence ou l'absence du site de restriction affecté par la substitution nucléotidique. L'amplicon constitué de 192pb était digéré par *Nla* III en 2 fragments de 112 et 76 paires de bases pour l'allèle T et non digéré pour l'allèle C.

Il s'agissait de la même méthode d'analyse pour les polymorphismes +405 et -460.

La méthode de détermination du polymorphisme -2549 était une PCR suivie directement d'une électrophorèse permettant de définir la présence ou l'absence de l'insertion. L'amplicon était constitué de 230 pb pour l'allèle I ou 212 pb pour l'allèle D.

Le SNP -1154 était analysé en utilisant une PCR en duplex. L'amplicon était ainsi constitué de 130 pb pour l'allèle A et de 152 pb pour l'allèle G.

Position	SNP	Fréquence allèle dans la pop		Taille amplicon (pb)	Enzyme de restriction	allèles	Taille fragments ADN (pb)
-2549 rs 35569394	D→I	0,55	0,45	212/230	/	D I	212 230
-1154 rs 1570360	G→A	0,67	0,37	152/130	/	G A	152 130
-460 rs 833061	C→T	0,47	0,53	174	<i>Bst</i> UI	C T	153/21 174
+405 rs 2010963	G→C	0,71	0,29	306	<i>Bsm</i> FI	G C	204/98 306
+936 rs 3025039	C→T	0,84	0,16	192	<i>Nla</i> III	C T	192 112/76

Tableau 4: Caractéristiques des techniques de PCR, des conditions de réactions et des fréquences alléliques (31, 35, 42, 43)

D. Analyse statistique

L'analyse a été réalisée grâce au logiciel IBM SPSS statistics version 20. La date de point est le 5 décembre 2013.

❖ Une première analyse descriptive a été conduite permettant d'évaluer les caractéristiques de la population étudiée (âge, sexe ratio, ECOG, score pronostique, nombre de sites métastatiques...). La répartition de la population a été calculée selon les effectifs et pourcentages.

Nous avons vérifié le postulat d'Hardy-Weinberg qui soutient que les fréquences génotypiques à un locus donné demeurent constantes de génération en génération si les cinq conditions suivantes sont respectées :

- la population est de grande taille
- il n'y a pas de sélection naturelle
- il n'y a pas de mutation
- il n'y a pas de migration, c'est-à-dire qu'aucune copie allélique n'est apportée de l'extérieur
- les unions sont aléatoires, le choix d'un partenaire ne dépend pas de son génotype.

L'écart par rapport à la loi de Hardy-Weinberg était estimé par le test khi 2 de Pearson, en comparant la structure des fréquences génotypiques obtenues à partir des données observées, aux fréquences calculées selon la loi de Hardy-Weinberg. Le test de khi 2 était un test à un degré de liberté (ddl). Le seuil de signification à 5% du khi 2, pour 1 ddl était à 3,84.

❖ Une analyse de survie a été réalisée par la méthode de Kaplan et Meier (44). La comparaison des courbes de survie a été faite grâce au test du Log Rank (45). La survie globale est définie par le délai entre la date du diagnostic de carcinome rénal et la date de décès. La survie globale métastatique est définie par le délai entre la date d'apparition des métastases et la date de décès. La survie sans métastase est définie par délai entre la date de diagnostic du carcinome rénal et l'apparition des premières métastases. La survie sans progression est caractérisée par le délai entre la date de début d'une ligne thérapeutique et la date de progression radiologique selon les critères RECIST 1.1 (46). Une analyse multivariée a également été faite utilisant le modèle de Cox (47) en ajustant selon les variables pronostiques déjà connues dans le carcinome rénal tel que le score de Heng et ses différentes composantes. Cette analyse a intéressé les covariables qui présentaient un $p < 0,2$ en analyse univariée.

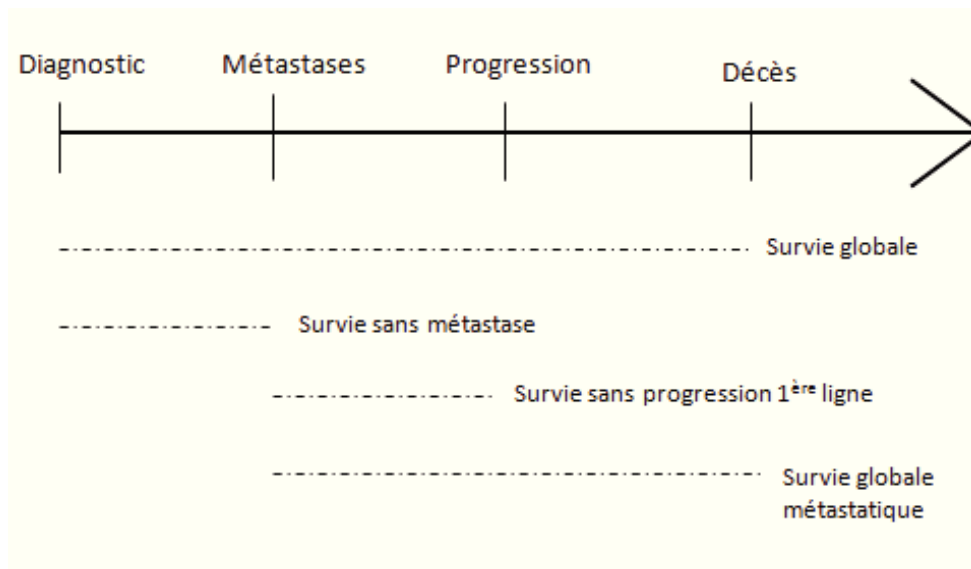


Figure 10 : Schéma explicatif des survies analysées dans l'étude

IV. RESULTATS

A. Caractéristiques de la population

Cinquante neuf patients ont été inclus. L'âge médian était de 62 ans avec des extrêmes de 35 ans à 82 ans. Le sexe ratio était de 2/1 pour les hommes. L'état général des patients était plutôt bon au diagnostic avec un ECOG à 1 pour 52% des patients.

Trente quatre patients présentaient un pronostic intermédiaire selon le score de Heng, quinze un bon pronostic et neuf un mauvais.

Quarante quatre (75%) patients ont eu une néphrectomie.

Trente quatre patients étaient d'emblée métastatiques au moment du diagnostic. Chez les patients non métastatiques au diagnostic, le délai médian d'apparition de localisations métachrones était de 19,4 mois. Quarante trois patients avaient au moins deux sites métastatiques (28 patients= 2sites, 10= 3 sites, 4= 4 sites, 1= 6 sites). Quarante cinq patients présentaient des métastases pulmonaires et 19 patients des métastases osseuses.

Quarante trois patients ont reçu du sunitinib en 1^{ère} ligne de traitement métastatique, 11 patients du sorafenib, 4 patients de l'everolimus et un patient du temsirolimus. (Tableau 5)

B. Répartition des polymorphismes

Cinq polymorphismes ont été étudiés. Concernant le polymorphisme +936, on pouvait noter l'absence de génotype T/T et une majorité de C/C.

La répartition des différents polymorphismes était identique à celle d'une population témoins de 200 patients donneurs volontaires de l'EFS de Tours. Concernant le postulat d'Hardy Weinberg, les différentes valeurs du khi 2 obtenues étant inférieures à 3,84, notre population suivait la loi de Hardy-Weinberg. (Tableau 6)

	Effectifs (N)	Pourcentage
Age médian		62 (35-82)
Sexe (total)	59	
Masculin	43	73%
Féminin	16	27%
ECOG		
0	23	39%
1	31	52%
2	3	5%
3	2	4%
Score de Fürhmann		
2	17	29%
3	23	39%
4	9	15%
Données manquantes	10	17%
Métastatique au diagnostic	34	57,6%
Néphrectomie	44	74,6%
Nbr de sites métastatiques		
1	16	27%
2	28	47%
3	10	17%
4	4	7%
6	1	2%
Sites métastastatiques		
Hépatiques	12	20%
osseuses	19	32%
pulmonaires	45	76%
Score pronostique Heng		
bon	15	25%
intermédiaire	25	58%
mauvais	9	15%
Données manquantes	1	2%
1 ^{ère} ligne de traitement		
sunitinib	43	73%
sorafenib	11	18%
everolimus	4	7%
temsirolimus	1	2%

Tableau 5 : Caractéristiques de la population étudiée. Les variables quantitatives sont exprimées en effectifs et pourcentage. Les variables qualitatives sont calculées en médiane avec leur intervalle de confiance à 95%.

SNP	Patients (n=59)	Khi 2
+405		1,38
C/G	26 (44,1%)	
G/G	28 (47,5%)	
C/C	5 (8,5%)	
-460 T/C		0,19
T/T	18 (30,5%)	
T/C	28 (47,5%)	
C/C	13 (22%)	
-2549		3,42
I/D	24 (40,7%)	
D/D	17 (28,8%)	
I/I	18 (30,5%)	
-1154		2,14
A/G	22 (37,3%)	
G/G	29 (49,2%)	
A/A	8 (13,6%)	
+936		2,84
C/T	17 (28,8%)	
C/C	42 (71,2%)	
T/T	0 (0%)	

Tableau 6 : Répartition des polymorphismes du VEGF dans la population étudiée.

C. Analyse de survie univariée

Le recul médian par rapport au début du traitement était de 22,4 mois (intervalle de 1,28 à 97,4 mois).

1. Survie globale

La survie globale était évaluée à 76,7 mois (IC95% : 45,7 - 107,7) pour les patients ayant le polymorphisme +936 C/C et 26,5 mois (IC95% : 16,7 - 36,3) pour les patients porteurs du SNP +936 C/T ($p=0,021$).

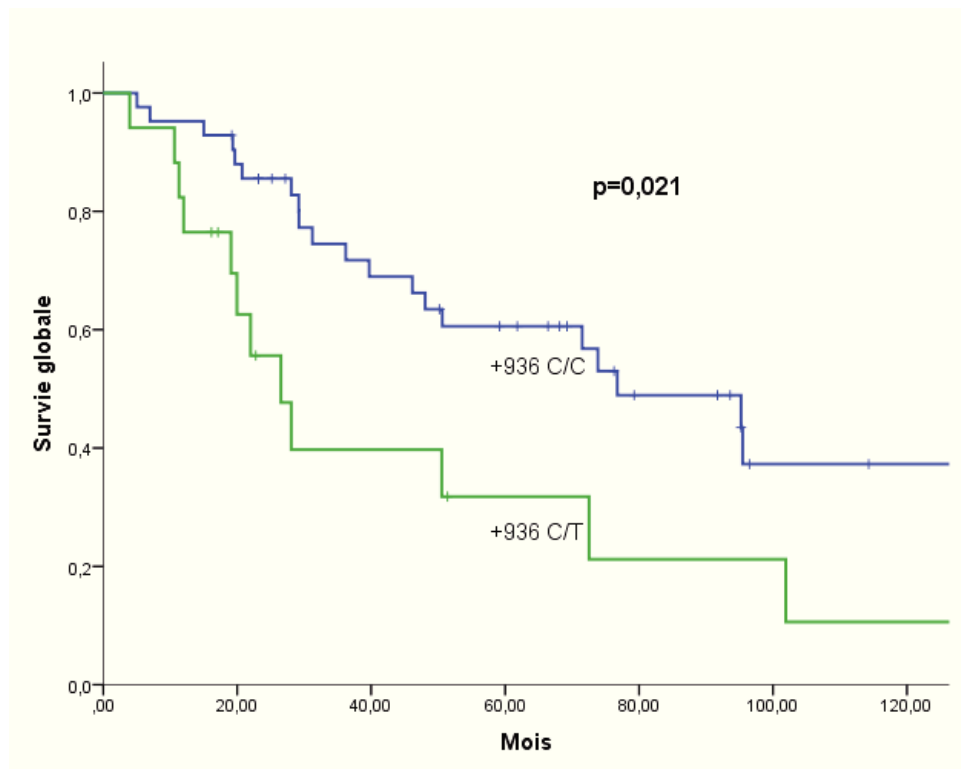


Figure 11 : Courbe de survie globale en fonction du SNP +936C/T.

La survie globale ne variait pas de manière significative en fonction des 4 autres SNPs analysés. Le score de Heng et l'état général influençaient de manière significative la survie globale. Le taux d'hémoglobine, de plaquettes et de neutrophiles semblaient influencer sur la survie globale mais de manière non significative. Ces différents taux sont des marqueurs de l'inflammation et sont inclus dans le score de Heng (Tableau 7).

covariables	Survie globale (mois)	p
SNP +936		0,021
C/C	77	
C/T	26	
SNP +405		0,61
C/G	51	
G/G	72	
C/C	19	
SNP -460		0,24
T/T	50	
T/C	48	
C/C	95	
SNP -1154		0,81
A/G	71	
G/G	51	
A/A	29	
SNP -2549		0,21
I/D	40	
D/D	51	
I/I	95	
Score de Heng		0,001
Bon	101	
Intermédiaire	46	
Mauvais	22	
ECOG		0,059
≤ 1	72	
>1	22	
Taux Hb		0,136
H >13 ; F >12	77	
H <13 ; F <12	36	
Calcémie		0,227
< 2,6	71	
> 2,6	19	
Neutrophilie		0,163
< 7500	72	
>7500	26	
Plaquettes		0,072
<450 000	72	
>450 000	22	
Fürhmann		0,58
≤ 2	50	
>2	71	

Tableau 7 : Survie globale (médiane) selon les autres variables
P calculé selon la méthode le log rank

2. Survie globale métastatique

La survie globale métastatique était de 22 mois (IC95% : 11,4 – 32,6) pour les patients ayant le polymorphisme +936 C/T et 67,1 mois (IC95% : 34,5 – 99,6) pour ceux ayant uniquement l'allèle C ($p=0,006$).

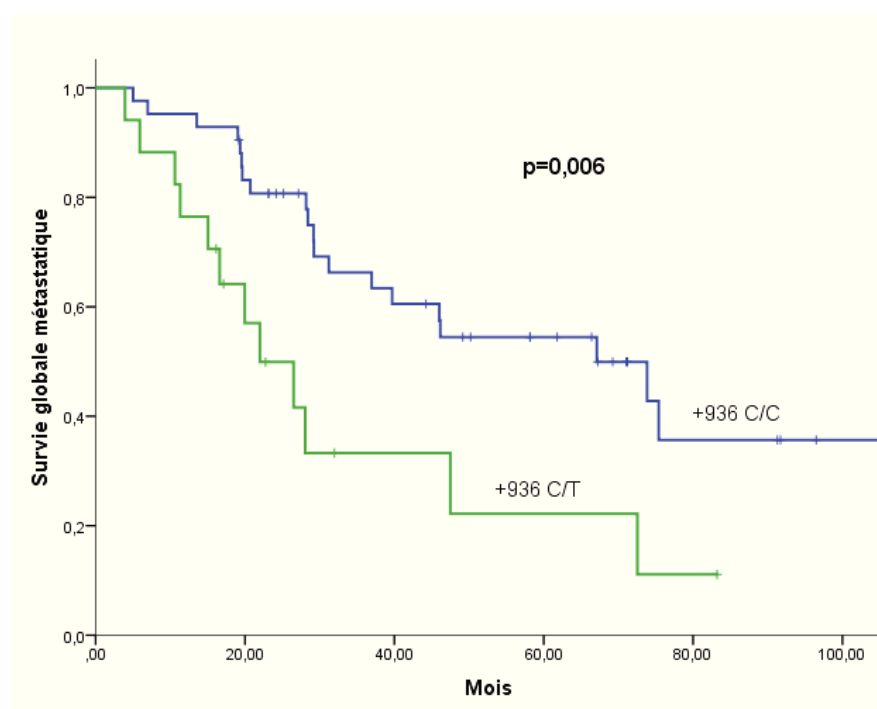


Figure 12: Courbe de survie globale métastatique selon le SNP +936C/T.

Les quatre autres polymorphismes du VEGF n'influençaient pas de manière significative la survie globale métastatique. Le score de Heng ainsi que le taux de polynucléaires neutrophiles influençaient la survie globale métastatique (Tableau 8). Les autres variables du score de Heng (ECOG, calcémie, taux d'hémoglobine et plaquettes) n'influaient pas sur la survie globale métastatique.

covariables	Survie globale m éta (mois)	p
SNP +936		0,006
C/C	67	
C/T	22	
SNP +405		0,26
C/G	46	
G/G	67	
C/C	17	
SNP -460		0,19
T/T	29	
T/C	46	
C/C	72	
SNP -1154		0,56
A/G	46	
G/G	46	
A/A	29	
SNP -2549		0,26
I/D	40	
D/D	31	
I/I	72	
Score de Heng		0,04
Bon	75	
Intermédiaire	46	
Mauvais	22	
ECOG		0,15
≤ 1	47	
>1	22	
Taux Hb		0,45
H >13 ; F >12	72	
H <13 ; F <12	29	
Calcémie		0,35
< 2,6	46	
> 2,6	15	
Neutrophilie		0,04
< 7500	61	
>7500	21	
Plaquettes		0,19
<450 000	46	
>450 000	22	
Fürhmann		0,63
≤ 2	47	
>2	46	

Tableau 8 : Survie globale métastatique (médiane) selon les autres variables
P calculé selon la méthode du log rank

3. Survie sans métastase

La médiane de la survie sans métastase était de 0 car 34 patients (59%) étaient d'emblée métastatiques au diagnostic. Nous avons donc calculé une moyenne.

Il n'y avait pas de différence en terme de survie sans métastase selon le polymorphisme +936 C/T ($p=0,69$). La moyenne de survie sans métastase était de 14,7 mois pour les patients ayant le génotype +936 C/T vs 16,4 mois pour ceux porteurs du SNP +936 C/C.

Chez les patients non métastatiques au diagnostic, le polymorphisme +936 n'influait pas de manière significative la survie sans métastase. La médiane de SSM était de 20,1 mois pour les patients ayant le SNP +936 C/C vs 6,1 mois pour les patients ayant le SNP +936 C/T ($p=0,95$).

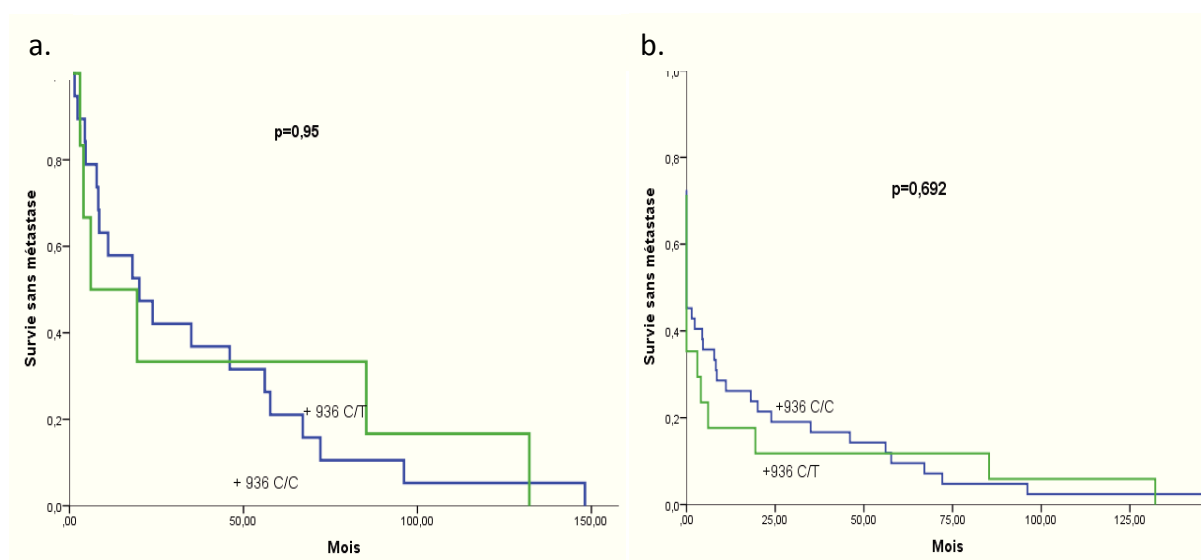


Figure 13 : Courbe de survie sans métastase en fonction du SNP + 936 C/T (a) chez les patients non métastatiques au diagnostics, (b) chez tous les patients de l'étude.

L'analyse des autres polymorphismes ne montrait aucune différence significative concernant la survie sans métastase.

4. Survie sans progression 1^{ère} ligne métastatique

Le polymorphisme +936 influençait également de manière significative la survie sans progression en 1^{ère} ligne de traitement. Ainsi, les patients porteurs du SNP +936 C/C avaient une SSP1L de 18,4 mois (IC95: 8,7 - 28,1) et les patients présentant le SNP +936 C/T de 7,9 mois (IC 95: 5,1 - 10,9). $p = 0,005$

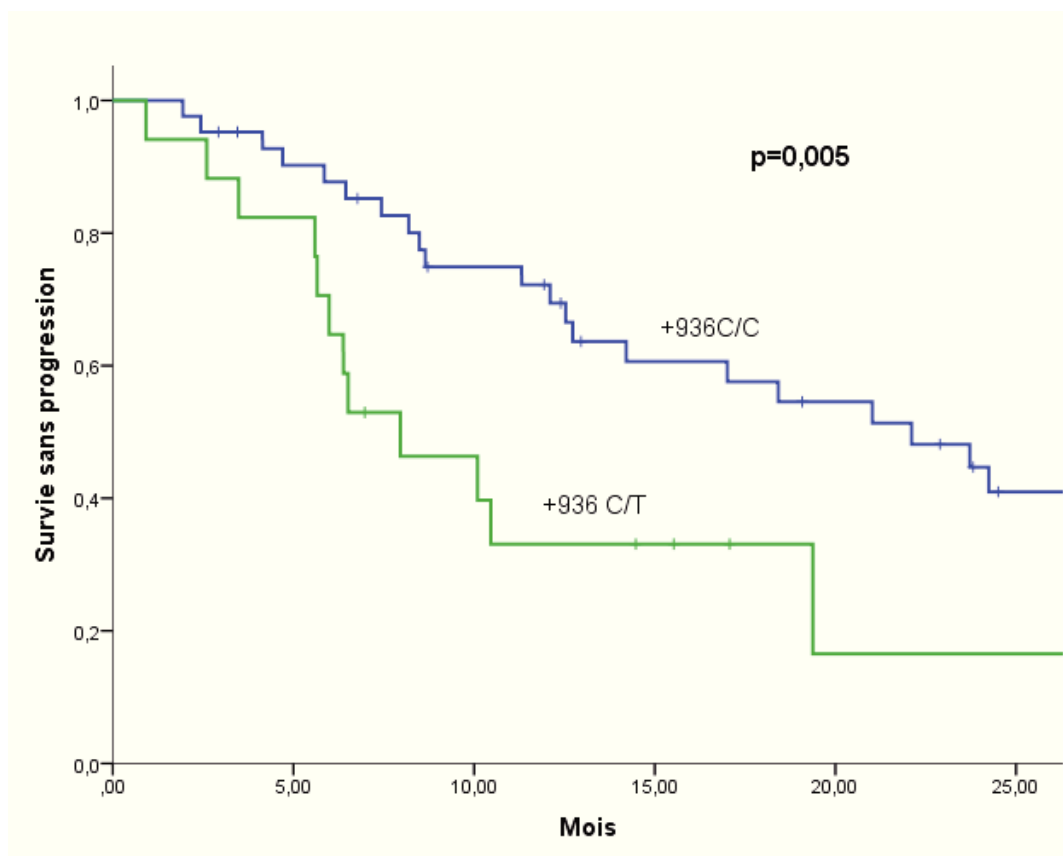


Figure 14 : Courbe de survie sans progression en 1^{ère} ligne métastatique en fonction du SNP +936C/T.

Concernant les autres polymorphismes, il n'a pas été montré de différence significative. Le score de Heng n'influçait pas de manière significative la survie sans progression. Cependant, certaines variables du score de Heng, notamment le taux d'hémoglobine et de neutrophiles semblent influencer sur la survie sans progression. De même, la survie sans progression variait selon le score de Fürhmann mais de manière non statistiquement significative. (Tableau 9)

covariables	Survie sans progression 1 ^{ère} ligne méta (mois)	p
SNP +936		0,005
C/C	22	
C/T	8	
SNP +405		0,69
C/G	23	
G/G	17	
C/C	7	
SNP -460		0,81
T/T	14	
T/C	17	
C/C	19	
SNP -1154		0,51
A/G	18	
G/G	21	
A/A	10	
SNP -2549		0,99
I/D	12	
D/D	23	
I/I	18	
Score de Heng		0,42
Bon	22	
Intermédiaire	13	
Mauvais	12	
ECOG		0,68
≤ 1	19	
>1	17	
Taux Hb		0,19
H >13 ; F >12	19	
H <13 ; F <12	12	
Calcémie		0,92
< 2,6	17	
> 2,6	7	
Neutrophilie		0,05
< 7500	19	
>7500	8	
Plaquettes		0,84
<450 000	17	
>450 000	21	
Fürhmann		0,29
≤ 2	22	
>2	12	

Tableau 9: Survie sans progression (médiane) en première ligne métastatique selon les autres variables
P calculé selon la méthode log rank

D. Analyse de survie multivariée

1. Survie globale

En analyse univariée, la survie globale était deux fois plus importante chez les patients présentant le polymorphisme +936C/C comparé à ceux qui avaient le SNP +936C/T. De même, le score de Heng influençait de manière significative la survie globale. Cependant, après ajustement selon le score de Heng, les patients présentant le SNP +936C/C conservaient un bénéfice en survie globale, mais qui n'était plus statistiquement significatif. Hazard ratio 1,9 (IC 95%: 0,92 - 3,96). (Tableau 10)

Facteur de risque		Nombre de décès (%)	Survie globale (IC95)	Hazard ratio (IC95)	Hazard ratio ajusté selon Heng (IC95)
Score de Heng	Bon	6 (18%)	101,9 (4,7 - 107)	3,08 (1,6 - 5,9)	
	Intermédiaire	22 (67%)	46,1 (21 - 70,9)		
	Mauvais	5 (15%)	22 (14,2 - 29,7)		
+936	C/C	21 (63%)	76,7 (4,7 - 199)	2,28 (1,6 - 5,9)	1,9 (0,92 - 3,96)
	C/T	12 (36%)	26,5 (16,7 - 36)		

Tableau 10: Hazard ratio et survie globale selon le polymorphisme +936C/T en analyse multivariée.

2. Survie globale métastatique

Le score de Heng et le polymorphisme +936C/T influençaient de manière significative la survie globale métastatique en analyse univariée. Elle était évaluée respectivement à 22 mois, 46 mois et 75 mois pour les groupes de mauvais, intermédiaire et bon pronostique. Ces deux facteurs étaient des facteurs pronostiques indépendants en analyse multivariée. Le hazard ratio ajusté selon le score de Heng était de 2,25 (IC 95% : 1,08 - 4,7). (Tableau 11)

Facteur de risque		Nombre de décès (%)	Survie globale métastatique (IC95)	Hazard ratio (IC95)	Hazard ratio ajusté selon Heng (IC95)
Score de Heng	Bon	6 (18%)	75,4 (20 - 130)	2,11 (1,11 - 4,0)	
	Intermédiaire	22 (67%)	46,1 (24 - 68)		
	Mauvais	5 (15%)	22,1 (13 - 31)		
+936	C/C	21 (63%)	67,1 (34 - 99)	2,66 (1,29 - 5,5)	2,25 (1,08 - 4,7)
	C/T	12 (37%)	22,1 (11 - 33)		

Tableau 11 : Hazard ratio et survie globale métastatique selon le polymorphisme +936C/T en analyse multivariée.

3. Survie sans progression 1^{ère} ligne de traitement

En analyse univariée le score de Heng n'était pas statistiquement significatif. Nous avons donc intégré dans l'analyse multivariée des composantes de ce score (taux d'hémoglobine et polynucléaires neutrophiles) qui semblent influencer la survie sans progression. Nous n'avons pas intégré le score de Fuhrmann car il existait trop de données manquantes.

Le polymorphisme +936 C/C conservait une valeur pronostique indépendante en analyse multivariée en tenant compte du taux d'hémoglobine et de polynucléaires neutrophiles avec un hazard ratio ajusté selon ces données biologiques à 2,9 (IC 95% : 1,4 - 6,1). (Tableau 12)

Facteur de risque		Nombre de d'évènements (%)	Survie sans progression 1 ^{ère} ligne (IC95)	Hazard ratio (IC95)	Hazard ratio ajusté selon Hb et PNN (IC95)
Taux d'Hb	H> 13 ; F> 12	19 (51%)	19,4 (6 - 32)	1,5 (0,8 - 2,9)	
	H< 13 ; F< 12	18 (49%)	12 (2 - 22)		
Neutrophiles	PNN< 7500	28 (76%)	19,4 (13 - 26)	2,1 (0,97 - 4,6)	
	PNN> 7500	9 (24%)	8,5 (4 - 13)		
+936	C/C	25 (66%)	22,1 (13 - 31)	2,63 (1,3 - 5,3)	2,9 (1,4 - 6,1)
	C/T	13 (34%)	7,9 (3 - 13)		

Tableau 12: Hazard ratio et survie sans progression en 1^{ère} ligne de traitement selon le polymorphisme +936C/T en analyse multivariée.

V. DISCUSSION

Dans cette analyse rétrospective, notre objectif était d'étudier l'impact des polymorphismes du VEGF ayant démontré un intérêt en pathologie tumorale, en tant que facteur pronostique du cancer du rein métastatique à cellules claires. Nous avons observé une association significative entre le polymorphisme +936 et la durée de la phase métastatique du carcinome rénal à cellules claires.

Les patients porteurs du SNP +936 C/C avaient une médiane de survie globale significativement supérieure à celle des patients porteurs du SNP +936 C/T (77 mois vs 26 mois $p=0,021$). Cette augmentation de la survie globale était indépendante de la durée de la survie sans métastase mais était liée à une augmentation de la survie globale en phase métastatique et notamment de la survie sans progression en 1^{ère} ligne de traitement. Les patients porteurs du SNP +936 C/C avait une survie globale métastatique de 67 mois vs 22 mois pour les patients porteurs du SNP +936 C/T ($p=0,006$). Les autres SNPs n'avaient pas de valeur pronostique. Parmi les autres facteurs pronostiques analysés, le score de Heng influençait la survie globale métastatique et non la survie sans progression. En analyse multivariée le polymorphisme +936 conservait une valeur pronostique indépendante tant sur la survie globale métastatique que sur la survie sans progression mais pas sur la survie globale.

Dans notre analyse, on confirme l'intérêt du score de Heng comme facteur pronostique sur la survie dans le carcinome rénal métastatique à cellules claires. Ce score n'a pas été développé pour prédire la survie sans progression mais en tant que facteur pronostique sur la survie globale en phase métastatique (15). Dans notre étude, le SNP +936 C/C influençait la survie globale en phase métastatique indépendamment du score de Heng, mais également la survie sans progression. Il augmentait la durée de survie et notamment la durée de vie en phase métastatique. Le SNP +936 C/T semble donc être un marqueur associé à l'agressivité de la tumeur lors de la phase métastatique et donc un facteur pronostique.

A. Rôle pronostique des polymorphismes du VEGF

Notre travail est la première étude à montrer un probable lien entre le SNP +936 C/T et la survie globale métastatique du cancer du rein. Ce polymorphisme pourrait être un marqueur pronostique. L'allèle T du SNP +936 semble être associé à une tumeur plus agressive ce qui pourrait s'expliquer par une possible interaction avec l'angiogénèse et le type de VEGF circulant.

Le SNP +936 C/T semble être également impliqué dans d'autres pathologies cancéreuses. Ainsi Kim et al. en 2008 (48), ont analysé l'influence des SNPs du VEGF sur la survie globale de 445 patients présentant un cancer colo rectal opéré non métastatique et n'ayant pas reçu de traitement complémentaire. Ils ont démontré que les patients porteurs du SNP +936C/C avaient une survie globale améliorée par rapport aux patients qui ont l'allèle T. De même, Bradbury et al. (49) en 2009 ont analysé l'évolution de 361 patients présentant un cancer de l'œsophage tout stade confondu. Les patients porteurs du SNP +936 C/T avaient une survie globale améliorée (38 mois vs 25 mois, $p = 0,04$), ces résultats restaient statistiquement significatif en analyse après ajustement selon l'âge, le sexe, l'état général et le stade tumoral.

D'autres SNPs du VEGF et du VEGFR semblent également intéressants en tant que facteurs pronostiques de pathologies tumorales.

En 2013, Scartozzi *et al.* (50) ont montré que les patients porteurs des polymorphismes -460 T/T, +405 C/C et -2578 C/C, avaient une survie globale diminuées lorsqu'ils recevaient du sunitinib en première ligne métastatique. Seul le SNP -460 T/T restait significatif en survie globale lors de l'analyse multivariée. De même, Van der Veldt en 2011 a établi un lien entre les SNPs 1718 A/A, A/T du VEGFR2 et une survie globale augmentée chez des patients également traités par sunitinib en première ligne métastatique (51). En 2008, Schneider *et al.* (33) ont examiné la relation entre différents SNPs du VEGF et l'efficacité du traitement par paclitaxel + bevacizumab chez 363 patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique. Les résultats ont montré un lien entre le génotype -2578 A/A du VEGFA, la présence de l'allèle A au niveau -1154 et une survie globale améliorée chez les patientes recevant la bithérapie.

B. Rôle prédictif de réponse des polymorphismes du VEGF

Dans notre étude, il existait également une augmentation de la survie sans progression chez les patients ayant l'allèle T du SNP +936. On pourrait discuter un rôle prédictif de réponse aux traitements anti-angiogéniques car ces SNPs semblent influencer sur le taux de VEGF circulant et sur les différents isoformes (pro et anti angiogéniques). (28, 42)

Xu et al. en 2011 (52), en analysant la population de trois essais cliniques différents, ont mis en évidence un lien entre les SNP -2578 A/C, -1498 C/T, -634 G/C et le taux de réponse au pazopanib. Il n'est pas établi de relation avec le SNP +936 C/T.

En termes de toxicité, Garcia-Donas et al.(53) ont établi un lien entre le SNP +405 et la survenue d'une hypertension artérielle chez les patients traités par sunitinib. Or, il existe un lien entre la survenue d'une HTA sous sunitinib et l'évolution de la maladie. Les SNPs du VEGF pourraient donc être des biomarqueurs intéressants de réponse aux traitements anti-angiogéniques.

Les SNPs du VEGF en tant que facteurs prédictifs semblent également être intéressants dans d'autres pathologies tumorales. En 2011, Grimaldi et al. (54) ont analysé l'évolution de 137 patientes présentant un carcinome mammaire métastatique en 1^{ère} ligne de chimiothérapie associée à du bévécizumab. Ils ont montré un lien entre le SNP +936 C/C et une durée jusqu'à la progression diminuée. L'analyse d'autres SNPs (-2578 C/A, -1498 T/C, -1154 G/A et -634 G/C) n'étaient pas contributive. Hansen et al. en 2011, (32) ont analysé l'évolution tumorale de 72 patients présentant un cancer colorectal métastatique traités en 1^{ère} ligne par capécitabine et oxaliplatine. Il existait un lien entre les SNPs -2578 C/T et -405 C/G et la survie sans progression.

Les données de la littérature ne sont pas toujours concordantes et il est difficile d'identifier avec certitude des polymorphismes précis, comme facteur pronostique ou prédictif dans le carcinome rénal métastatique.

C. Mécanismes possibles impliquant les SNPs dans la réponse aux traitements et dans le pronostic tumoral

Les différents SNPs du gène du VEGF peuvent influencer l'expression du VEGF à différents niveaux: type d'épissage alternatif, taux de sécrétion du VEGF, formes de VEGF sécrétées (VEGF-Axxx^b anti-angiogénique ou VEGF-Axx pro-angiogénique)

L'allèle T du SNP +936C/T est associé à une baisse de la production de VEGF (42). A l'inverse l'allèle G du SNP -1154G/A est quant à lui associé à une augmentation de la production du VEGF (55). De même l'allèle T du SNP -460C/T est associé in vitro à l'activation du promoteur du gène (56). Concernant les deux autres polymorphismes -2578C/A et +405G/C une augmentation et une baisse du taux de VEGF peuvent y être associées.

Cependant, ces études sont à moduler en fonction de la régulation complexe du VEGF. Tout d'abord, à partir de l'épissage alternatif de l'ARNm du VEGFA, il existe deux familles de protéines qui se nomment VEGF-Axxx (ayant un rôle pro-angiogénique) et VEGF-Axxx^b (ayant un rôle anti-angiogénique) (28). De plus, une partie importante du VEGF est liée à la matrice extra cellulaire, la fraction circulante dosable reflète les isoformes de bas poids moléculaires et les fractions digérées par les protéases lors de la dégradation de la matrice extra cellulaire. Il existe probablement un rôle important autocrine et paracrine non reflétée par la fraction circulante du VEGF (57).

D. Points forts de notre étude

Les patients porteurs du SNP +936C/C avaient une survie globale métastatique et une survie sans progression améliorées de manière significative par rapport aux patients qui ont le SNP +936C/T. Ce SNP conservait une valeur pronostique indépendante en analyse multivariée. Le score de Heng influe sur la survie dans le cadre du carcinome à cellules claires métastatique, ce qui est confirmé dans notre travail. Ce score, à l'inverse du SNP +936, n'influait pas la survie sans progression. Le SNP +936 semble donc être un facteur pronostique de la maladie métastatique. Dans notre analyse statistique nous avons sélectionné le score de Heng car il a été établi chez des patients traités par anti-angiogéniques qui restent la base de la prise en charge du carcinome rénal métastatique. En effet, le score de Motzer a été établi pour les

malades traités par INF α , et le score français du groupe d'immunothérapie concerne uniquement les traitements pas cytokines.

Notre étude s'est portée sur l'analyse de patients européens d'origine caucasienne. Les polymorphismes génétiques sont différents selon les origines ethniques des patients. Notre population était homogène. De même, nous n'avons inclus que des carcinomes à cellules claires, qui est l'histologie la plus fréquente du cancer du rein et la mieux connue.

Les polymorphismes sélectionnés dans notre étude ont été analysés dans d'autres pathologies tumorales et parfois avec une influence importante sur l'histoire de la maladie (32, 33, 48). Leurs analyses dans la pathologie rénale semblent donc pertinentes.

A notre connaissance, il s'agit de la première étude qui a mis en évidence le SNP +936C/T en tant que facteur pronostique du carcinome rénal métastatique.

Le mode d'analyse des différents SNPs du VEGF est une technique aisée. En effet, un prélèvement sanguin après accord du patient permet d'avoir l'échantillon. Les deux techniques de PCR (RFLP et multiplex) sont bien connues, reproductibles et valides. Elles sont effectuées au sein d'un laboratoire de recherche clinique, sont utilisées en pratique courante et sont peu coûteuses.

E. Points faibles de notre travail

Notre échantillon est de petite taille (n=59). Il s'agit également d'une étude rétrospective unicentrique et donc soumise à de possibles biais liés à la multiplication des tests. De plus les différences de séquences des traitements anti-angiogéniques peuvent influencer sur la survie globale.

Les études citées précédemment soulignent l'intérêt de l'analyse d'autres polymorphismes et notamment du VEGF-R2. Le récepteur au VEGF est au cœur du processus de néoangiogénèse du carcinome rénal à cellules claires. Analyser ses différents SNPs pourraient peut être permettre d'isoler de nouveaux facteurs pronostiques.

VI. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les polymorphismes du VEGF et du VEGFR sont au cœur de nombreux travaux de recherche. L'étude de cinq polymorphismes du VEGF chez 59 patients présentant un cancer du rein métastatique, a permis d'identifier le SNP +936C/C comme probable facteur de bon pronostic. La présence de ce SNP semble améliorer la durée de la période métastatique. Ces résultats sont à confirmer sur un échantillon plus important ou dans le cadre d'une étude prospective.

Les SNPs du VEGF pourraient contribuer à l'élaboration d'un nouveau score pronostique dans le cadre des carcinomes rénaux à cellules claires métastatiques traités par anti-angiogéniques. Le score de Heng, actuellement disponible dans le carcinome rénal métastatique à cellules claires, est développé sur des données cliniques et biologiques. Intégrer des facteurs génétiques dans un score pronostique pourrait améliorer la prise en charge thérapeutique.

Les perspectives d'un tel travail sont particulièrement importantes car elles permettraient à l'avenir de dépister les patients de bon pronostic et peut être d'envisager un traitement adapté moins lourd et donc moins toxique. Identifier des marqueurs génétiques pour une médecine personnalisée.

VII. BIBLIOGRAPHIE

1. Rebillard X, Grosclaude P, Leone N, Velten M, Coureau G, Villers A, et al. [Incidence and mortality of urological cancers in 2012 in France]. *Progres en urologie : journal de l'Association francaise d'urologie et de la Societe francaise d'urologie*. 2013;23 Suppl 2:S57-65.
2. Macleod LC, Hotaling JM, Wright JL, Davenport MT, Gore JL, Harper J, et al. Risk factors for renal cell carcinoma in the VITAL study. *The Journal of urology*. 2013;190(5):1657-61.
3. Escudier B, Eisen T, Porta C, Patard JJ, Khoo V, Algaba F, et al. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;23 Suppl 7:vii65-71.
4. Niceforo J, Coughlin BF. Diagnosis of renal cell carcinoma: value of fine-needle aspiration cytology in patients with metastases or contraindications to nephrectomy. *AJR American journal of roentgenology*. 1993;161(6):1303-5.
5. Mejean A, Correas JM, Thiounn N, Chretien Y, Helenon O, Dufour B, et al. [Conservative treatment of kidney cancer by cryoablation and radiofrequency]. *Progres en urologie : journal de l'Association francaise d'urologie et de la Societe francaise d'urologie*. 2006;16(2):101-4.
6. Tuncali K, vanSonnenberg E, Shankar S, Morteale KJ, Cibas ES, Silverman SG. Evaluation of patients referred for percutaneous ablation of renal tumors: importance of a preprocedural diagnosis. *AJR American journal of roentgenology*. 2004;183(3):575-82.
7. Rybicki FJ, Shu KM, Cibas ES, Fielding JR, vanSonnenberg E, Silverman SG. Percutaneous biopsy of renal masses: sensitivity and negative predictive value stratified by clinical setting and size of masses. *AJR American journal of roentgenology*. 2003;180(5):1281-7.
8. Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Montironi R, Kirkali Z. 2004 WHO classification of the renal tumors of the adults. *European urology*. 2006;49(5):798-805.
9. Srigley JR, Delahunt B, Eble JN, Egevad L, Epstein JI, Grignon D, et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia. *The American journal of surgical pathology*. 2013;37(10):1469-89.
10. Cairns P. Renal cell carcinoma. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*. 2010;9(1-6):461-73.
11. Zisman A, Pantuck AJ, Dorey F, Said JW, Shvarts O, Quintana D, et al. Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19(6):1649-57.
12. Zigeuner R, Hutterer G, Chromecki T, Imamovic A, Kampel-Kettner K, Rehak P, et al. External validation of the Mayo Clinic stage, size, grade, and necrosis (SSIGN) score for clear-cell renal cell carcinoma in a single European centre applying routine pathology. *European urology*. 2010;57(1):102-9.
13. Mekhail TM, Abou-Jawde RM, Boumerhi G, Malhi S, Wood L, Elson P, et al. Validation and extension of the Memorial Sloan-Kettering prognostic factors model for survival in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(4):832-41.
14. Negrier S, Escudier B, Gomez F, Douillard JY, Ravaud A, Chevreau C, et al. Prognostic factors of survival and rapid progression in 782 patients with metastatic renal carcinomas treated by cytokines: a report from the Groupe Francais d'Immunotherapie. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2002;13(9):1460-8.
15. Heng DY, Xie W, Regan MM, Harshman LC, Bjarnason GA, Vaishampayan UN, et al. External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: a population-based study. *The lancet oncology*. 2013;14(2):141-8.
16. Porpiglia F, Volpe A, Billia M, Scarpa RM. Laparoscopic versus open partial nephrectomy: analysis of the current literature. *European urology*. 2008;53(4):732-42; discussion 42-3.

17. Escudier B, Bellmunt J, Negrier S, Bajetta E, Melichar B, Bracarda S, et al. Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(13):2144-50.
18. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2007;356(2):125-34.
19. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2007;356(2):115-24.
20. Sternberg CN, Davis ID, Mardiak J, Szczylik C, Lee E, Wagstaff J, et al. Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(6):1061-8.
21. Rini BI, Escudier B, Tomczak P, Kaprin A, Szczylik C, Hutson TE, et al. Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): a randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2011;378(9807):1931-9.
22. Neuzillet Y, Karam G, Lechevallier E, Kleinclauss F, Comite Transplantation de l'Association Francaise d'U. [MTOR inhibitors: from transplantation to oncology. AFU 2006 Transplantation Committee Review of the literature]. *Progres en urologie : journal de l'Association francaise d'urologie et de la Societe francaise d'urologie*. 2007;17(5):928-33.
23. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2007;356(22):2271-81.
24. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet*. 2008;372(9637):449-56.
25. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. 2003;9(6):669-76.
26. Foster K, Prowse A, van den Berg A, Fleming S, Hulsbeek MM, Crossey PA, et al. Somatic mutations of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in non-familial clear cell renal carcinoma. *Human molecular genetics*. 1994;3(12):2169-73.
27. Edeline J, Vigneau C, Patard JJ, Rioux-Leclercq N. [Signalling pathways in renal-cell carcinoma: from the molecular biology to the future therapy]. *Bulletin du cancer*. 2010;97:5-15.
28. Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nature reviews Cancer*. 2008;8(11):880-7.
29. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer research*. 2002;62(14):4123-31.
30. Na X, Wu G, Ryan CK, Schoen SR, di'Santagnese PA, Messing EM. Overproduction of vascular endothelial growth factor related to von Hippel-Lindau tumor suppressor gene mutations and hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in renal cell carcinomas. *The Journal of urology*. 2003;170(2 Pt 1):588-92.
31. Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine*. 2000;12(8):1232-5.
32. Hansen TF, Garm Spindler KL, Andersen RF, Lindebjerg J, Brandslund I, Jakobsen A. The predictive value of genetic variations in the vascular endothelial growth factor A gene in metastatic colorectal cancer. *The pharmacogenomics journal*. 2011;11(1):53-60.
33. Schneider BP, Wang M, Radovich M, Sledge GW, Badve S, Thor A, et al. Association of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 genetic polymorphisms with outcome in a trial of paclitaxel compared with paclitaxel plus bevacizumab in advanced breast cancer: ECOG 2100. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(28):4672-8.

34. Churchill AJ, Carter JG, Ramsden C, Turner SJ, Yeung A, Brenchley PE, et al. VEGF polymorphisms are associated with severity of diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2008;49(8):3611-6.
35. Yang B, Cross DF, Ollerenshaw M, Millward BA, Demaine AG. Polymorphisms of the vascular endothelial growth factor and susceptibility to diabetic microvascular complications in patients with type 1 diabetes mellitus. *Journal of diabetes and its complications*. 2003;17(1):1-6.
36. Bruyere F, Hovens CM, Marson MN, d'Arcier BF, Costello AJ, Watier H, et al. VEGF polymorphisms are associated with an increasing risk of developing renal cell carcinoma. *The Journal of urology*. 2010;184(4):1273-8.
37. Kawai Y, Sakano S, Korenaga Y, Eguchi S, Naito K. Associations of single nucleotide polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene with the characteristics and prognosis of renal cell carcinomas. *European urology*. 2007;52(4):1147-55.
38. Kim JJ, Vaziri SA, Rini BI, Elson P, Garcia JA, Wirka R, et al. Association of VEGF and VEGFR2 single nucleotide polymorphisms with hypertension and clinical outcome in metastatic clear cell renal cell carcinoma patients treated with sunitinib. *Cancer*. 2012;118(7):1946-54.
39. Rini BI, Cohen DP, Lu DR, Chen I, Hariharan S, Gore ME, et al. Hypertension as a biomarker of efficacy in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103(9):763-73.
40. Poprach A, Pavlik T, Melichar B, Puzanov I, Dusek L, Bortlicek Z, et al. Skin toxicity and efficacy of sunitinib and sorafenib in metastatic renal cell carcinoma: a national registry-based study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;23(12):3137-43.
41. Beuselinck B, Karadimou A, Lambrechts D, Claes B, Wolter P, Couchy G, et al. Single-nucleotide polymorphisms associated with outcome in metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib. *British journal of cancer*. 2013;108(4):887-900.
42. Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *Journal of vascular research*. 2000;37(6):443-8.
43. Brogan JJ, Khan N, Isaac K, Hutchinson JA, Pravica V, Hutchinson IV. Novel polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Human immunology*. 1999;60(12):1245-9.
44. Pocock SJ, Assmann SE, Enos LE, Kasten LE. Subgroup analysis, covariate adjustment and baseline comparisons in clinical trial reporting: current practice and problems. *Statistics in medicine*. 2002;21(19):2917-30.
45. Coldman AJ, Elwood JM. Examining survival data. *Canadian Medical Association journal*. 1979;121(8):1065-8, 71.
46. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European journal of cancer*. 2009;45(2):228-47.
47. Gill R. Understanding Cox's regression model. *Experientia Supplementum*. 1982;41:187-99.
48. Kim JG, Chae YS, Sohn SK, Cho YY, Moon JH, Park JY, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms associated with prognosis for patients with colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(1):62-6.
49. Bradbury PA, Zhai R, Ma C, Xu W, Hopkins J, Kulke MJ, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms and esophageal cancer prognosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(14):4680-5.
50. Scartozzi M, Bianconi M, Faloppi L, Loretelli C, Bittoni A, Del Prete M, et al. VEGF and VEGFR polymorphisms affect clinical outcome in advanced renal cell carcinoma patients receiving first-line sunitinib. *British journal of cancer*. 2013;108(5):1126-32.
51. van der Veldt AA, Eechoute K, Gelderblom H, Gietema J, Guchelaar HJ, van Erp NP, et al. Genetic polymorphisms associated with a prolonged progression-free survival in patients with metastatic renal cell cancer treated with sunitinib. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(3):620-9.

52. Xu CF, Bing NX, Ball HA, Rajagopalan D, Sternberg CN, Hutson TE, et al. Pazopanib efficacy in renal cell carcinoma: evidence for predictive genetic markers in angiogenesis-related and exposure-related genes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(18):2557-64.
53. Garcia-Donas J, Esteban E, Leandro-Garcia LJ, Castellano DE, del Alba AG, Climent MA, et al. Single nucleotide polymorphism associations with response and toxic effects in patients with advanced renal-cell carcinoma treated with first-line sunitinib: a multicentre, observational, prospective study. *The lancet oncology*. 2011;12(12):1143-50.
54. Etienne-Grimaldi MC, Formento P, Degeorges A, Pierga JY, Delva R, Pivot X, et al. Prospective analysis of the impact of VEGF-A gene polymorphisms on the pharmacodynamics of bevacizumab-based therapy in metastatic breast cancer patients. *British journal of clinical pharmacology*. 2011;71(6):921-8.
55. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2002;13(1):260-4.
56. Stevens A, Soden J, Brenchley PE, Ralph S, Ray DW. Haplotype analysis of the polymorphic human vascular endothelial growth factor gene promoter. *Cancer research*. 2003;63(4):812-6.
57. Adamcic U, Skowronski K, Peters C, Morrison J, Coomber BL. The effect of bevacizumab on human malignant melanoma cells with functional VEGF/VEGFR2 autocrine and intracrine signaling loops. *Neoplasia*. 2012;14(7):612-23.

VIII. ANNEXES

VIII. ANNEXES

ETUDE PROPOLYRE

Etude du rôle PRONostique des POLYmorphismes du VEGF dans le carcinome REnal métastatique à cellules claires

Recherche biomédicale

Promoteur

Association Tours autogreffe

2 bis, boulevard Tonnelle
Hôpital Bretonneau
37000 Tours
Tel : 02.47.47.37.12

Investigateur-coordonateur

Professeur Claude Linassier

Service d'oncologie médicale
Hôpital Bretonneau
2 boulevard Tonnelle
37000 Tours
Tel : 02.47.47.99.19

Attachée de Recherche Clinique :

Madame Bettina Malivoir
Service d'oncologie médicale
Hôpital Bretonneau
2 boulevard Tonnelle
37000 Tours
Tel : 02.47.47.86.25

Type d'étude : Mise en évidence d'un facteur pronostique dans le carcinome rénal métastatique à cellules claires

Numéro d'enregistrement eudraCT : 2014-000372-26

RESUME DU PROTOCOLE

Titre	Etude du rôle pronostique des polymorphismes du VEGF dans le carcinome rénal métastatique à cellules claires (étude PROPOLYRE)
Promoteur	Tours autogreffe
Investigateur-Coordonateur	Professeur Claude Linassier
Investigateurs	Professeur Stéphane Oudard Professeur Franck Bruyère
Num eudraCT	2014-000372-26
Justification Contexte	<p>Le gène du VEGF-A (rôle dans l'angiogénèse sanguine) est localisé sur le chromosome 6p21.3. Il est constitué de 8 exons et 7 introns. Le polymorphisme de nucléotide simple (SNP), résulte de la modification d'un seul nucléotide dans un gène sans conséquence clinique ou pathologique. Une cinquantaine de SNPs ont été décrit pour le gène du VEGF. Cinq SNPs sont particulièrement décrits -2549 I/D, -1154 G/A, -460 T/C dans la région promotrice, +405 G/C dans la région non transcrite 5' et +936 C/T dans la région non transcrite 3'. Bruyère <i>et al.</i> en 2010 ont analysé ces 5 polymorphismes du VEGF chez 202 individus contrôles et 51 patients présentant un cancer du rein et ont montré que le polymorphisme -460 C/T influençait le risque de survenue du cancer du rein.</p> <p>Nous avons repris la population étudiée dans l'étude du CHU de Tours dirigée par F. Bruyère. Nous avons actualisé notre population en sélectionnant les patients qui ont développé une maladie métastatique et pour laquelle un traitement anti-angiogénique a été instauré. Nous n'avons pas refait d'analyse biologique.</p> <p>Une étude préliminaire a été effectuée chez ces 37 patients sélectionnés. La survie globale était significativement meilleure chez les patients porteurs du SNP +936 C/C par rapport au SNP+936 C/T (médiane 71 mois vs 26 mois p= 0,023). La survie globale métastatique était également augmentée de manière significative chez les patients porteurs du SNP +936 C/C (médiane 46 mois vs 22 mois p=0,006). Le polymorphisme +936 conservait une valeur pronostique indépendante en analyse multivariée tant sur la survie globale que sur la survie globale métastatique.</p>
Objectif principal	Déterminer sur une cohorte confirmatoire si certains polymorphismes du VEGF sont des facteurs pronostiques sur la survie globale dans le cancer du rein à cellules claires métastatique.
Objectifs secondaires	Déterminer si certains polymorphismes du VEGF influent la phase métastatique et donc la survie globale métastatique et la survie sans progression en première ligne de traitement anti-angiogénique. Evaluer l'influence des polymorphismes sur la maladie non métastatique.

Critère de jugement principal	Survie globale
Méthode	Analyse rétrospective et prospective confirmatoire Bi-centrique : CHU Bretonneau, Hôpital Européen Georges Pompidou
Critères d'inclusion	Histologie : carcinome rénal à cellules claires confirmé sur pièce de néphrectomie ou biopsie de rein ou métastase Maladie métastatique Traitements par des agents anti-angiogéniques (sunitib, bevacizumab, everolimus, axitinb, temsirolimus et sorafenib)
Critères de non inclusion	Autres histologies: papillaire, composante sarcomateuse Traitement par immunothérapie seule
Procédure	<p>Les patients sont identifiés lors d'une consultation ou hospitalisation dans le service d'oncologie médicale. Sont inclus tous les patients suivis pour un carcinome rénal à cellules claires métastatique, traités par anti-angiogéniques.</p> <p>Les échantillons d'ADN sont obtenus à partir de prélèvement sanguin veineux après recueil du consentement éclairé du patient. A l'occasion d'un bilan sanguin en consultation ou en hospitalisation, est prélevé un tube supplémentaire pour l'analyse des polymorphismes du VEGF. Le consentement de la personne est recueilli par écrit préalablement à la réalisation de l'examen, après qu'elle ait été dûment informée de sa nature et de sa finalité. Le patient peut bénéficier d'un délai de réflexion de plusieurs jours à trois semaines.</p> <p>L'analyse biologique est réalisée au sein du laboratoire d'immunologie du CHU de Bretonneau. Cinq polymorphismes du VEGF sont étudiés : -2549 D/I (rs35569394), -460C/T (rs833061), -1154G/A (rs1570360), +405G/C – rs2010963) et +936C/T (rs3025039). Il s'agit de la même analyse biologique que l'étude de 2010.</p> <p>L'analyse statistique est réalisée grâce au logiciel IBM SPSS statistics version 20. Une première analyse descriptive est conduite permettant d'évaluer les caractéristiques de la population étudiée. Une analyse de survie est ensuite réalisée par la méthode de Kaplan et Meier. La comparaison des courbes de survie est faite grâce au test du Log Rank. Une analyse multivariée est également faite utilisant le modèle de Cox en tenant compte du score de Heng. Cette analyse intéresse les variables statistiquement significatives en analyse univariée.</p>
Nombre de patients	Dans la cohorte de patients de l'étude de Bruyère et al., la probabilité de survie à 26 mois, estimée selon la méthode de Kaplan-Meier, était de 32% dans le groupe de patients porteurs de l'haplotype CC et de 73% dans le groupe avec haplotype GC. La fréquence des haplotypes CC et GC dans l'ensemble de la cohorte étaient de 30% et 70% respectivement. Le calcul

	<p>des effectifs a été réalisé selon la méthode proposée par Freedman, en utilisant la méthode <i>stpower</i> du logiciel Stata version 12. Les conditions de calcul étaient les suivantes : test bilatéral, $S1 = 0.60$ $S2 = 0.35$, risque $\alpha = 0.05$, risque $\beta = 0.8$, hazard ratio = 2.05. Le nombre total de patients à inclure est de 123 (86 dans le groupe GC et 37 dans le groupe CC). L'analyse sera réalisée après survenue de 59 évènements.</p>
Durée de la recherche	<p>Début d'inclusion : 1/4/2014 Fin d'inclusion : 1/4/2016</p>
Retombées attendues	<p>Les SNPs sont susceptibles de représenter un bio marqueur important pouvant expliquer dans une certaine mesure des variations de réponses inter individuelles. Ils constituent une approche intéressante dans la recherche de médecine personnalisée.</p> <p>Les SNPs pourraient être intégrés dans un nouveau score pronostique du carcinome rénal métastatique prenant en compte des données génétiques.</p>

Sommaire

I.	INTRODUCTION	61
A.	Généralités	61
B.	Importance de l'angiogénèse dans le cancer du rein à cellules claires.....	62
C.	Polymorphisme du VEGF et autres cancers	63
II.	Objectifs de l'étude :	64
III.	Conception et déroulement de la recherche :	64
A.	Schéma de l'étude :	64
B.	Critères d'inclusion :	66
C.	Critères de non-inclusion :	67
D.	Analyses biologiques :	67
E.	Analyses statistiques :	67
F.	Plan d'échantillonnage :	68
G.	Durée de l'étude :	69
H.	Nombre de centres :	69
IV.	Aspects administratifs et éthiques	69
A.	Contrôle et assurance de la qualité.....	69
B.	Indemnisation des sujets.....	69
C.	Comité de Protection des Personnes	70
D.	Consentement éclairé et information du patient	70
V.	Confidentialité des données de l'étude	70
A.	Archivage des données.....	71
B.	Devenir des échantillons au décours de la recherche.....	71
VI.	Bénéfices attendus, contraintes liées à la participation	72
A.	Effets indésirables	72
B.	Bénéfices attendus	72
VII.	Publication des résultats	73
VIII.	Bibliographie.....	74
IX.	Annexes	75

LISTE DES ABREVIATIONS

3' UTR:	3' UnTranslated Region
5' UTR:	5' UnTranslated Region
ADN:	Acide désoxyribonucléique
CPP :	Comité de Protection des Personnes
ECOG:	Eastern Cooperative Oncology Group
IL2:	Interleukin 2
INF α :	Interferon α
mTOR:	Mammalian Target Of Rapamycin
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PDGF:	Platelet Derived Growth Factor
RECIST:	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphism
SNP:	Single Nucleotide Polymorphism
TGF:	Tumor Growth Factor
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R:	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VHL:	Von Hippel Lindau

I. INTRODUCTION

A. Généralités

Le cancer du rein représente 2 à 3% des tumeurs malignes de l'adulte ce qui correspond en France à près de 8000 nouveaux cas chaque année. Il est responsable de 2500 décès par an en France. Dans 70 à 80% des cas, il s'agit de tumeurs à cellules claires hypervascularisées en lien avec une inactivation du gène suppresseur de tumeur le Von Hippel Lindau induisant une activation du système du VEGF. Plus rarement il s'agit de tumeur papillaire (10 à 20%) ou de tumeur chromophile (5%). Un tiers des patients est diagnostiqué d'emblée au stade métastatique, et, parmi les patients présentant une forme localisée, environ 30% vont développer des métastases.

Au stade métastatique il existe plusieurs scores pronostiques. Le score de Motzer et le score français d'immunothérapie ont été développés chez des patients traités par cytokines : interleukine 2 et interféron alpha. Récemment, d'après l'analyse de 645 patients, Heng *et al.* établissent un nouveau score pronostique chez les patients présentant un cancer du rein métastatique traités par anti-angiogéniques.

Ainsi les patients sont classés en 3 groupes selon 6 variables :

- Taux d'hémoglobine < N
- Calcémie > N
- Indice de Karnofsky < 80%
- Polynucléaires neutrophiles > N
- Plaquettes > N
- Durée entre diagnostic et début des traitements < 1an

Le cancer du rein métastatique est chimiorésistant. Jusqu'à 2005, le traitement standard est l'immunothérapie avec l'utilisation de deux cytokines l'interleukine 2 et l'interféron α . Depuis 2006, le traitement du carcinome rénal métastatique repose sur les thérapies ciblées à visée anti-angiogénique : inhibiteurs de tyrosine kinase actifs sur le VEGF et VEGFR et des inhibiteurs de mTOR. Ces différents traitements ont pour cible principale le VEGF et son récepteur, ils ont une efficacité et un taux de toxicité très variables en fonction des patients.

B. Importance de l'angiogénèse dans le cancer du rein à cellules claires

Le cancer du rein à cellules claires est une tumeur hypervascularisée avec une angiogénèse importante. Une des mutations précoces identifiées dans son développement concerne le gène suppresseur de tumeur Von Hippel-Lindau (VHL). L'inactivation du gène VHL (double mutation inactivatrice) induit une séquence de transcription de plusieurs gènes impliqués dans l'angiogénèse et la prolifération cellulaire. Ces gènes sont le vascular endothelial growth factor (VEGF), le platelet derived growth factor (PDGF) ou encore le transforming growth factor (TGF α). Le VEGF qui se lie à un des différents isomères du récepteur au VEGF est l'élément clé de l'angiogénèse en induisant la migration des cellules endothéliales, leur prolifération et leur survie.

Le gène du VEGF-A est localisé sur le chromosome 6p21.3. Il est constitué de 8 exons et 7 introns. Le polymorphisme de nucléotide simple (SNP), résulte de la modification d'un seul nucléotide dans un gène sans conséquence clinique ou pathologique. Une cinquantaine de SNPs ont été décrit pour le gène du VEGF. Cinq SNPs sont particulièrement décrits -2549 I/D, -1154 G/A, -460 T/C dans la région promotrice, +405 G/C dans la région non transcrite 5' et +936 C/T dans la région non transcrite 3'.

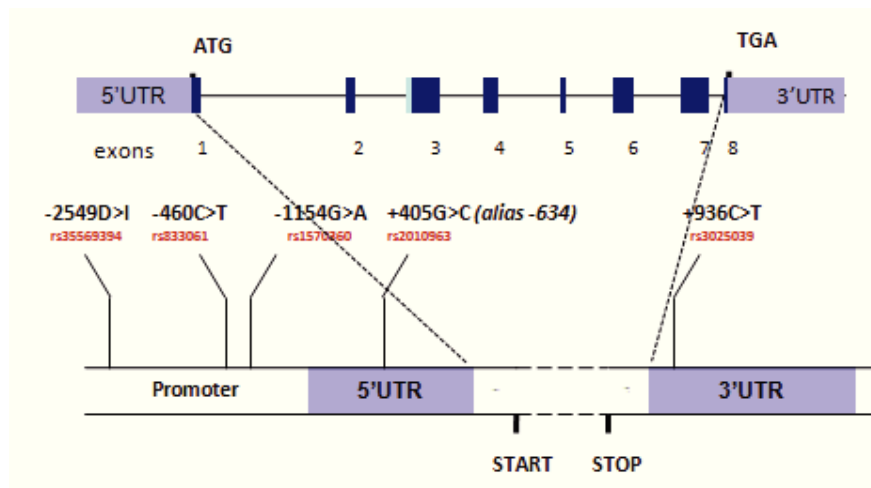


Figure 1 : gène du VEGF

Bruyère *et al.* en 2010 ont analysé 5 polymorphismes du VEGF chez 202 individus contrôles et 51 patients présentant un cancer du rein et ont montré que le polymorphisme -460 C/T influençait le risque de survenue du cancer du rein. De même en 2007 Kawai *et al.* retrouvaient une association entre le polymorphisme -1154G/A et des tumeurs de plus petite taille et de stade tumorale moins important. Le polymorphisme -2578C/A semblait également associé à une invasion lymphatique moindre et une survie spécifique augmentée. Kim *et al.* en 2010 ont montré une association significative entre le SNP -634 G/G et le développement d'une hypertension artérielle sous traitement par sunitinib.

C. Polymorphisme du VEGF et autres cancers

De nombreuses études suggèrent un possible lien entre des variations génétiques de la voie de l'angiogénèse et l'évolution globale de certains cancers. Ainsi, en 2010 Hansen *et al.* ont analysé l'évolution de 72 cancers colo rectaux métastatiques traités par Xelox en première ligne. Certains génotypes du VEGF notamment le -2578 A/A et C/C ; -460 C/C et T/T ; -405 G/G et C/C sont associés à un taux de réponse augmenté.

En 2008, Schneider *et al.* ont examiné la relation entre différents SNPs du VEGF et l'efficacité du traitement par paclitaxel + bevacizumab chez 363 patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique. Les résultats ont montré un lien entre le génotype -2578 A/A du VEGFA, la présence de l'allèle A au niveau -1154 et une survie globale améliorée chez les patientes recevant la bithérapie.

De même, Kim *et al.* en 2008, en analysant 445 patients présentant un cancer colo rectal, ont démontré que les patients porteurs du SNP +936C/C ont une survie globale améliorée par rapport aux patients qui ont l'allèle T.

II. Objectifs de l'étude :

Le VEGF est au centre de la problématique du carcinome à cellules claires. Il existe une importante variabilité inter individuelle au niveau du gène du VEGF (polymorphisme nucléotidique simple). De plus, les thérapies actuelles ont pour cible le VEGF et son récepteur. On fait également le constat de grandes variations de réponses aux différents traitements avec des degrés de toxicité très variables. Notre travail consiste à déterminer sur une cohorte confirmatoire si certains polymorphismes du VEGF sont des facteurs pronostiques dans le cancer du rein à cellules claires métastatique et s'ils influent sur la réponse aux différents traitements anti angiogéniques.

III. Conception et déroulement de la recherche :

A. Schéma de l'étude :

Nous avons repris la population étudiée dans l'étude du CHU de Tours dirigée par F. Bruyère analysant ces cinq polymorphismes du VEGF chez 253 patients en tant que facteur de risque de survenue de carcinome rénal. Sont inclus 202 individus contrôles et 51 patients présentant un carcinome rénal. Nous avons actualisé notre population en sélectionnant les patients qui ont développé une maladie métastatique et pour laquelle un traitement anti angiogénique a été instauré. Nous n'avons pas refait d'analyse biologique.

Une étude préliminaire a été effectuée chez ces 37 patients sélectionnés. La survie globale était significativement meilleure chez les patients porteurs du SNP +936 C/C par rapport au SNP+936 C/T (médiane 71 mois vs 26 mois $p=0,023$). La survie globale métastatique était également augmentée de manière significative chez les patients porteurs du SNP +936 C/C (médiane 46 mois vs 22 mois $p=0,006$). Par contre il n'existait pas de différence significative de la survie sans métastase en fonction du polymorphisme +936. On retrouvait une tendance d'augmentation de la survie sans progression en 1^{ère} ligne métastatique chez les patients porteurs du SNP +936 C/C versus +936 C/T (médiane 17 mois vs 8 mois $p=0,12$). Le

polymorphisme +936 C/C conservait une valeur pronostique indépendante en analyse multivariée tant sur la survie globale que sur la survie globale métastatique.

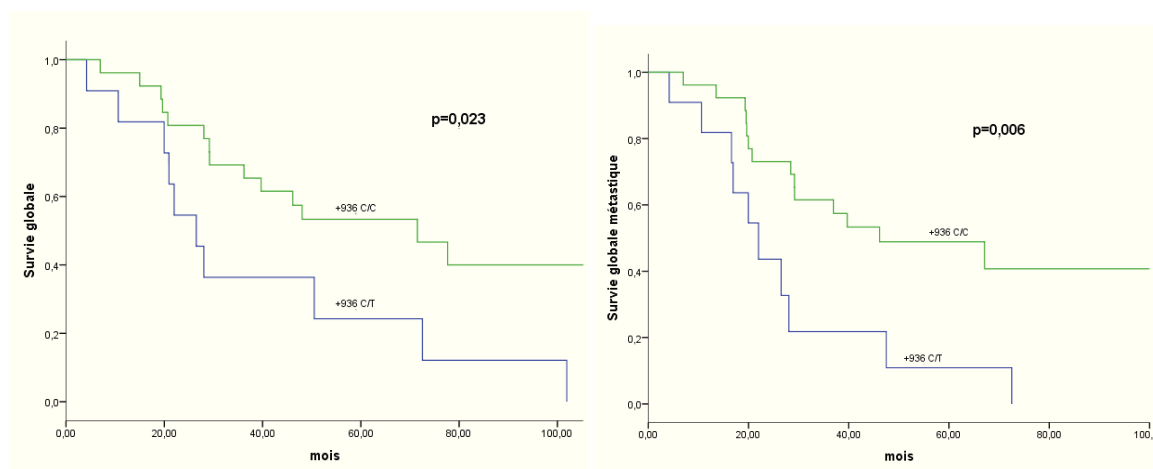


Figure 2: survie globale et survie globale métastatique en fonction du SNP 936.

Ces résultats sont à confirmer sur une étude avec un plus grand nombre de patients. Il s'agit donc d'une analyse confirmatoire prospective et rétrospective. Ce travail est mené au CHU de Tours et à l'hôpital européen Georges Pompidou. Les échantillons d'ADN sont obtenus à partir de prélèvement sanguin veineux après recueil du consentement éclairé du patient. A l'occasion d'un bilan sanguin en consultation ou en hospitalisation, est prélevé un tube supplémentaire (tube EDTA) pour l'analyse des polymorphismes du VEGF. Le consentement de la personne est recueilli par écrit préalablement à la réalisation de l'examen, après qu'elle ait été dûment informée de sa nature et de sa finalité. Le consentement mentionne la finalité de l'examen. Le patient peut bénéficier d'un délai de réflexion de trois semaines.

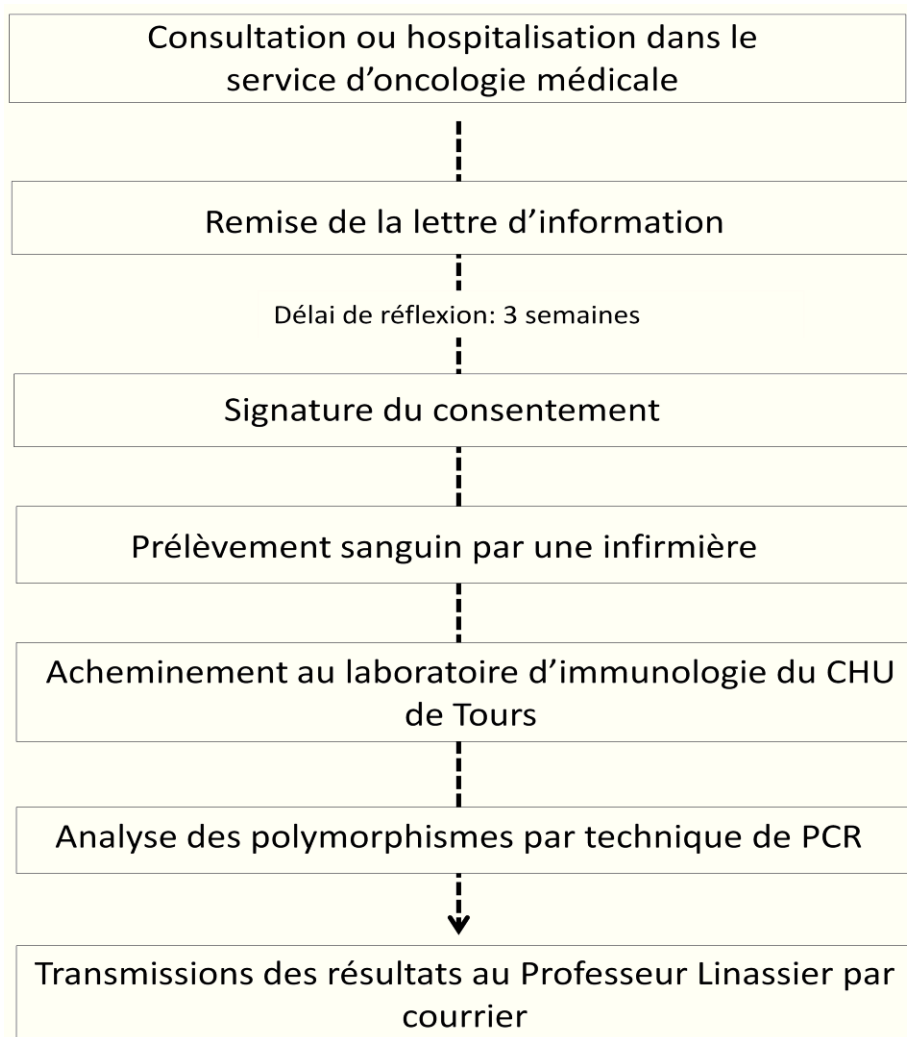


Figure 3 : synthèse des différentes étapes de l'étude.

B. Critères d'inclusion :

Les critères d'inclusion sont :

- histologie : carcinome à cellules claires (confirmée par néphrectomie ou biopsie de rein ou métastase)
- maladie métastatique
- traitement reçu : anti-angiogénique
- homme ou femme ; ≥ 18 ans

C. Critères de non-inclusion :

Ne sont pas inclus :

- Histologie : papillaire, composante sarcomateuse
- Traitement par immunothérapie seule
- ≤ 18 ans

D. Analyses biologiques :

L'analyse biologique est réalisée au sein du laboratoire d'immunologie du CHU de Bretonneau, par Valérie Gouilleux. Cinq polymorphismes du VEGF sont étudiés -2549 D/I (rs35569394), -460C/T (rs833061), -1154G/A (rs1570360), +405G/C –rs2010963) et +936C/T (rs3025039). Ces polymorphismes sont fréquents dans la population générale, ils ont démontré un intérêt dans diverses pathologies tumorales et ont un lien avec la production de VEGF. Ces différents polymorphismes ont été analysés par deux techniques de PCR. La PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) suppose que le polymorphisme modifie les sites de restrictions et génère des fragments d'ADN différents en nombre et en taille. L'autre technique est la PCR multiplex qui est l'amplification simultanée de plusieurs séquences cibles dans un même tube d'amplification, il existe alors une compétition d'affinité pour les amorces qui varie selon le polymorphisme.

E. Analyses statistiques :

L'analyse statistique est réalisée grâce au logiciel IBM SPSS statistics version 20.

Une première analyse descriptive est conduite permettant d'évaluer les caractéristiques de la population étudiée (âge, sexe ratio, ECOG, score pronostique, nombre de sites métastatique) et de vérifier le postulat d'Hardy-Weinberg. Ce postulat vérifie que les fréquences génotypiques à un locus donné demeurent constantes de génération en génération.

Une analyse de survie est ensuite réalisée par la méthode de Kaplan et Meier. La comparaison des courbes de survie est faite grâce au test du Log Rank.

Le critère d'évaluation principal est la survie globale. La survie globale est définie par le délai entre la date du diagnostic de carcinome rénal et la date de décès.

Les critères d'évaluation secondaires sont : la survie globale métastatique, la survie sans métastase et la survie sans progression en 1^{ère} ligne métastatique. La survie globale métastatique est définie par le délai entre la date d'apparition des métastases et la date de décès. La survie sans métastase est définie par délai entre la date de diagnostic du carcinome rénal et l'apparition des premières métastases. La survie sans progression est caractérisée par le délai entre la date de début d'une ligne thérapeutique et la date de progression radiologique selon les critères RECIST 1.1 .

Une analyse multivariée est également faite utilisant le modèle de Cox en tenant compte du score de Heng. Cette analyse intéresse les variables statistiquement significatives en analyse univariée.

F. Plan d'échantillonnage :

Dans la cohorte de patients de l'étude de Bruyère et al., la probabilité de survie à 26 mois, estimée selon la méthode de Kaplan-Meier, était de 32% dans le groupe de patients porteurs de l'haplotype CC et de 73% dans le groupe avec haplotype GC. La fréquence des haplotypes CC et GC dans l'ensemble de la cohorte étaient de 30% et 70% respectivement. Le calcul des effectifs a été réalisé selon la méthode proposée par Freedman, en utilisant la méthode *stpower* du logiciel Stata version 12.

Les conditions de calcul étaient les suivantes : test bilatéral, $S1= 0.60$ $S2= 0.35$, risque $\alpha=0.05$, risque $\beta=0.8$, hazard ratio = 2.05. Le nombre total de patients à inclure est de 123 (86 dans le groupe GC et 37 dans le groupe CC). L'analyse sera réalisée après survenue de 59 évènements.

G. Durée de l'étude :

La durée de l'étude est de deux ans avec une date de début le 1^{er} avril 2014. La date de fin d'inclusion correspond à la date de fin de recherche.

H. Nombre de centres :

Etude bi-centrique : (annexe 1)

- Service d'oncologie médicale, CHU de Tours
- Service d'oncologie médicale, Hôpital Européen Georges Pompidou

IV. Aspects administratifs et éthiques

A. Contrôle et assurance de la qualité

Un attaché de recherche clinique mandaté par le promoteur s'assurera de la bonne réalisation de l'étude, du recueil des données générées par écrit, de leur documentation, enregistrement et rapport. D'autre part, les investigateurs s'engagent à accepter les audits d'assurance qualité effectués par le promoteur ainsi que les inspections effectuées par les Autorités Compétentes. Toutes les données, tous les documents et rapports peuvent faire l'objet d'audits et d'inspections réglementaires sans que puisse être opposé le secret médical.

B. Indemnisation des sujets

Aucune indemnisation n'est prévue

C. Comité de Protection des Personnes

Le protocole, le formulaire d'information et l'attestation de consentement de l'étude seront soumis pour avis au CPP de Tours. La notification de l'avis favorable du CPP sera transmise au promoteur de l'étude et à l'autorité compétente. Une demande d'autorisation sera adressée par le promoteur à l'ANSM avant le début de l'étude.

D. Consentement éclairé et information du patient

Tous les patients inclus dans l'étude se verront remettre une lettre d'information (annexe 5) et devront signer un consentement éclairé (annexe 6), après une explication loyale et claire des objectifs de l'étude, de son design, des méthodes, des bénéfices potentiels ainsi que des risques. Les patients seront informés du caractère volontaire de leur participation et de leur liberté de retirer leur consentement à tout moment et sans avoir à en justifier la raison. Une copie du formulaire d'information et de consentement signé par les deux parties sera remise au patient, l'investigateur en conservera l'original.

V. Confidentialité des données de l'étude

Conformément aux dispositions concernant la confidentialité des données auxquelles ont accès les personnes chargées du contrôle de qualité d'une recherche biomédicale (article L.1121-3 du code de la santé publique), conformément aux dispositions relatives à la confidentialité des informations concernant les études, les personnes qui s'y prêtent et les résultats obtenus (article R. 5121-13 du code de la santé publique) ; les personnes ayant un accès direct prendront toutes les précautions nécessaires en vue d'assurer la confidentialité des informations relatives aux études, aux personnes qui s'y prêtent et notamment leur identité et les résultats obtenus.

Les investigateurs s'assureront que l'anonymat des patients est garanti et que leur identité n'est pas révélée à des personnes non autorisées.

Seules les trois premières lettres du nom et prénom du sujet seront enregistrées.

A. Archivage des données

Les documents seront archivés par le nom de l'étude dans les locaux du CHU de Tours jusqu'à la fin de la période d'utilité pratique.

Ces documents sont :

- Protocole et annexes
- Formulaires d'information et consentements originaux signés
- Données individuelles (copies authentifiées de données brutes)
- Analyses statistiques
- Rapport final de l'étude

A l'issue de la période d'utilité pratique, l'ensemble des documents à archiver sera transféré sur le site d'archivage (Service Central des Archives – CHU de Tours) et sera placé sous la responsabilité du Promoteur pendant 15 ans après la fin de l'étude conformément aux pratiques institutionnelles. Aucun déplacement ou destruction ne pourra être effectué sans l'accord du Promoteur. Au terme des 15 ans, le promoteur sera consulté pour destruction. Toutes les données, tous les documents et rapports pourront faire l'objet d'audit ou d'inspection.

B. Devenir des échantillons au décours de la recherche

A la fin de l'étude, les échantillons biologiques résultant de la prise en charge seront conservés dans une bio collection. Cette bio collection a pour but de réaliser des recherches supplémentaires en oncologie médicale. Elle sera déclarée au Ministère de l'enseignement et de la recherche. Le patient est informé de la création de cette bio collection dans la lettre d'information (annexe 4), avec possibilité d'annuler son consentement à l'utilisation de ces échantillons.

VI. Bénéfices attendus, contraintes liées à la participation

A. Effets indésirables

S'agissant d'une étude biologique, aucun évènement grave n'est possible directement en lien avec notre travail. Pour la plupart des gens, les piqures provoquées par l'aiguille lors de la prise de sang n'ont aucune conséquence. Néanmoins, elles peuvent entraîner chez certaines personnes un saignement, un hématome, une douleur ou une gêne.

L'inclusion dans notre protocole ne requiert pas la mise en place d'un comité de surveillance particulier. Les modalités de surveillance ne sont pas modifiées.

B. Bénéfices attendus

Les polymorphismes du VEGF et du VEGFR sont au cœur de nombreux travaux de recherche. L'étude de cinq polymorphismes du VEGF chez 37 patients présentant un cancer du rein métastatique, a permis d'identifier le SNP +936C/C comme probable facteur de bon pronostique. La présence de ce SNP semble améliorer la survie globale. Ces résultats sont à confirmer sur un échantillon plus important.

Les SNPs du VEGF pourraient contribuer à l'élaboration d'un nouveau score pronostique dans le cadre des carcinomes rénaux à cellules claires métastatiques traités par anti-angiogéniques. Seul existe le score de Heng qui est développé uniquement sur des données cliniques et biologiques. Intégrer des facteurs pronostiques génétiques dans un score pronostique pourrait améliorer la prise en charge thérapeutique.

Les SNPs sont susceptibles également de représenter un bio marqueur important pouvant expliquer dans une certaine mesure des variations de réponses inter individuelles. Ils constituent une approche intéressante dans la recherche de médecine personnalisée. La médecine personnalisée est une des voies les plus prometteuses en cancérologie. Elle consiste à traiter chaque patient de façon individualisée en fonction des spécificités génétiques et biologiques de sa tumeur.

VII. Publication des résultats

Les résultats seront publiés après revue complète des données cliniques et biologiques. Le premier auteur sera le rédacteur du texte de l'article. Le dernier auteur sera l'investigateur coordonnateur. Les personnes qui auront fait preuve d'une implication significative dans l'exécution et l'analyse des évaluations biologiques figureront dans la liste des auteurs. L'auteur considérera comme éligibles pour figurer comme co-auteur tout investigateur qui aura inclus 10% des patients évaluables.

VIII. Bibliographie

- Escudier, B., et al., *Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2012. **23 Suppl 7**: p. vii65-71.
- Bruyere, F., et al., *VEGF polymorphisms are associated with an increasing risk of developing renal cell carcinoma*. J Urol, 2010. **184**(4): p. 1273-8.
- Kawai, Y., et al., *Associations of single nucleotide polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene with the characteristics and prognosis of renal cell carcinomas*. Eur Urol, 2007. **52**(4): p. 1147-55.
- Beuselinck, B., et al., *Single-nucleotide polymorphisms associated with outcome in metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib*. Br J Cancer, 2013. **108**(4): p. 887-900.
- Scartozzi, M., et al., *VEGF and VEGFR polymorphisms affect clinical outcome in advanced renal cell carcinoma patients receiving first-line sunitinib*. Br J Cancer, 2013. **108**(5): p. 1126-32.
- Garcia-Donas, J., et al., *Single nucleotide polymorphism associations with response and toxic effects in patients with advanced renal-cell carcinoma treated with first-line sunitinib: a multicentre, observational, prospective study*. Lancet Oncol, 2011. **12**(12): p. 1143-50.
- Renner, W., et al., *A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels*. J Vasc Res, 2000. **37**(6): p. 443-8.
- Hansen, T.F., et al., *The predictive value of genetic variations in the vascular endothelial growth factor A gene in metastatic colorectal cancer*. Pharmacogenomics J, 2011. **11**(1): p. 53-60.
- Schneider, B.P., et al., *Association of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 genetic polymorphisms with outcome in a trial of paclitaxel compared with paclitaxel plus bevacizumab in advanced breast cancer: ECOG 2100*. J Clin Oncol, 2008. **26**(28): p. 4672-8.
- Kim, J.G., et al., *Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms associated with prognosis for patients with colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(1): p. 62-6.
- Freedman, L.S. *Tables of the number of patients required in clinical trials using the log-rank test*. Statistics in Medicine, 1982. **1**: 121-129

IX. Annexes

Annexe 1: Liste des investigateurs

Professeur Claude Linassier	Service d'oncologie médicale Hôpital Bretonneau Tel : 02.47.47.99.19 Fax : 02-47-47-99-20 claudelinassier@univ-tours.fr
Professeur Franck Bruyère	Service d'urologie Hôpital Bretonneau Tel : 02-34-38-95-42 Fax : 02-47-47-69-91 F-BRUYERE@chu-tours.fr
Professeur Stéphane OUDARD	Service d'oncologie médicale Hôpital Européen Georges Pompidou Tel : 01-56-09-34-47 Fax : 01-56-09-20-39 stephane.oudard@egp.aphp.fr

Annexe 2: Score ECOG (index de performance)

Grade	Score
0	Actif, pas de restriction dans les activités
1	Restreint dans ses activités mais ambulateur
2	Ambulateur et capable de s'occuper de lui-même mais incapable de travailler. Au lit ou au fauteuil moins de la moitié du temps de veille
3	Difficilement capable de s'occuper de lui-même, au lit ou au fauteuil plus de la moitié du temps de veille
4	Grabataire

Annexe 3: Stratégie thérapeutique du carcinome rénal métastatique

histologie et ligne	groupe pronostique	standard	option
cellules claires 1ère ligne	pronostic bon ou intermédiaire mauvais pronostic	sunitinib, bevacizumab + INF pazopanib temsirolimus	cytokines sunitinib sorafenib
cellules claires 2ème ligne	post cytokines post TKIs	sorafenib, pazopanib axitinib everolimus, axitinib	sunitinib sorafenib sorafenib
non à cellules claires			temsirolimus sunitinib sorafenib

Tableau 1 : Recommandations de l'ESMO pour le traitement médical du cancer du rein métastatique
(Escudier et al. 2012)

Bevacizumab (Avastin*) : anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF. Sa fixation sur le ligand circulant empêche l'activation du VEGF-R. Administré en intra veineux, 15mg/kg toutes les 3 semaines.

Sorafenib (Nexavar*) : inhibiteur de tyrosine kinase, administré par voie orale, 400mg 2 fois par jour. Il agit essentiellement sur le VEGF-R2 et R3.

Sunitinib (Sutent*) : inhibiteur de tyrosine kinase, administré par voie orale 50mg/j 4 semaines sur 6. Il agit sur le VEGF-R1 et R2.

Temsirolimus (Torisel*) : inhibiteur de mTor, agissant sur la voie PI3kinase-AKT. Administré en intra-veineux, 25mg/semaine.

Everolimus (Afinitor*) : inhibiteur de mTor, administré par voie orale, 10mg/jour en continu.

Pazopanib (Votrient*) : inhibiteur de tyrosine kinase actif sur le VEGF-R1, R2 et R3, administré par voie orale en continu 800mg/jour.

Axitinib (Inlyta*) : inhibiteur de tyrosine kinase actif sur le VEGF-R1, R2 et R3. Administré par voie orale à la posologie initiale de 5mg 2 fois par jour.

Annexe 4 : Liste des données recueillies

3 premières lettres du nom :

3 premières lettres du prénom :

Sexe :

Date de naissance :

Histologie:

Score Fuhrmann:

ECOG au diagnostic:

Date de diagnostic :

Date d'apparition des 1ères métastases:

Néphrectomie: oui non

Nombre de sites métastatiques :

Présence de métastases pulmonaires:

Présence de métastases osseuses:

Présence de métastases hépatiques :

Score de Heng :

1^{ère} ligne :

- Date début :
- Produit :
- Meilleur réponse :
- Cause changement :
- Progression : oui non
- Date progression :
- Toxicité :

2^{ème} ligne :

- Date début :
- Produit :
- Meilleur réponse :
- Cause changement :
- Progression : oui non
- Date progression :
- Toxicité :
- Toxicité:

Décès : oui non

Date de décès :

Etat à la date de point :

LETTRE D'INFORMATION
DESTINEE AUX PATIENTS
POUR PARTICIPATION A UNE RECHERCHE BIOMEDICALE

Titre de la recherche : Etude du rôle pronostique des polymorphismes du VEGF dans le carcinome rénal métastatique à cellules claires

Madame, Monsieur,

Nous vous sollicitons pour participer à une recherche biomédicale.

Nous vous présentons ci-dessous pour information, l'étude pour laquelle nous souhaitons votre participation volontaire. Nous vous laissons trois semaines pour réfléchir à cette proposition et restons à votre disposition pour répondre à toutes vos questions.

Responsable de l'étude :

Professeur Claude Linsassier, Oncologie médicale CHU Tours

Objectif de l'étude :

Le cancer du rein représente 2 à 3 % des tumeurs malignes de l'adulte. Dans 70 à 80% des cas il s'agit de tumeurs à cellules claires hypervascularisées en lien avec le système du VEGF. Le traitement du carcinome rénal métastatique repose sur les thérapies ciblées à visée anti-angiogénique, ces différents traitements ont pour cible principale le VEGF et son récepteur.

Chaque individu possède des caractéristiques génétiques qui lui sont propres. On parle de gènes et d'ADN. L'ADN est le support de l'information génétique, c'est à dire qu'il porte des milliers de gènes sous forme de succession de nucléotides.

Le gène du VEGF-A (rôle dans la vascularisation) est localisé sur le chromosome 6p21.3. Le polymorphisme de nucléotide simple, résulte de la modification d'un seul nucléotide dans un gène sans conséquence clinique ou pathologique. Des études ont montré que certains polymorphismes semblent influencer le risque de survenue de cancer du rein.

Notre travail consiste à déterminer si ces polymorphismes du VEGF sont des facteurs pronostiques dans le cancer du rein à cellules claires métastatique et s'ils influent sur la réponse aux différents traitements anti angiogéniques.

Déroulement de l'étude :

Vous êtes pris en charge dans le cadre de votre maladie soit au CHU de Tours soit à l'hôpital européen Georges Pompidou à Paris. Depuis quelques années, il a été démontré que dans le cancer du rein métastatique à cellules claires, de nombreux vaisseaux se développaient de façon anormale : c'est l'angiogénèse. Bien que ce processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins existe chez toute personne, ce processus est augmenté dans le cancer du rein et est responsable du développement des métastases. Cette néo-vascularisation est contrôlée par un régulateur qui est le VEGF.

Pour ralentir votre maladie, votre médecin vous a prescrit un médicament anti-angiogénique : Sutent*, Avastin*, Afinitor*, Torisel*, Inlyta*, Nexavar* ou Votrient*. Ces médicaments ont pour objectif de détruire les néovaisseaux qui permettent d'assurer la vascularisation des cellules tumorales, empêchant ainsi la survie et le développement des tumeurs. Ils ont pour cible le VEGF et son récepteur.

Afin d'analyser les polymorphismes du VEGF nous effectuons une prise de sang pour obtenir un échantillon de votre ADN. Après recueil de votre consentement, à l'occasion d'un bilan sanguin en consultation ou en hospitalisation, une infirmière prélève un tube supplémentaire. L'analyse biologique est réalisée au sein du laboratoire d'immunologie du CHU de Bretonneau à Tours, par Valérie Gouilleux.

Durée de l'étude :

L'étude débute le 1^{er} avril 2014 et la durée d'inclusion est de 2 ans. La participation à ce travail ne modifie pas votre prise en charge ni les modalités de surveillance tout au long du traitement.

Bénéfices attendus :

Une étude préliminaire a été effectuée chez 37 patients du CHU de Tours. Un des polymorphismes du gène du VEGF semble influencer le pronostic du carcinome rénal métastatique.

L'analyse des facteurs pronostiques et des facteurs prédictifs de réponse aux traitements anti angiogéniques est un enjeu important dans la prise en charge de cancer du rein métastatique.

Les polymorphismes sont susceptibles de représenter un bio marqueur important pouvant expliquer dans une certaine mesure des variations de réponses inter individuelles. Ils constituent une approche intéressante dans la recherche de médecine personnalisée. Ils pourraient également être intégrés dans un score pronostic prenant en compte des facteurs génétiques.

Risques potentiels :

Il n'existe aucune contrainte à participer à cette étude. Le prélèvement sanguin est réalisé lors d'une consultation ou d'une hospitalisation dans le service d'oncologie médicale par une infirmière diplômée d'état. Pour la plupart des gens, les piqûres provoquées par l'aiguille lors de la prise de sang n'ont aucune conséquence. Néanmoins, elles peuvent entraîner chez certaines personnes un saignement, un hématome, une douleur ou une gêne.

Frais médicaux :

Votre collaboration à ce protocole de recherche biomédicale n'entraînera pas de participation financière de votre part. Conformément à la loi, tous les frais liés à l'étude seront pris en charge par le promoteur de l'étude : Tours autogreffe.

Législation:

Conformément aux articles L. 1121-1 et suivants du Code de la Santé Publique, le Comité de Protection des Personnes de la région Centre a étudié ce projet et a émis un avis favorable à sa réalisation le ../../....

Un contrat d'assurance « *numéro de police : 145750* » a été souscrit par le promoteur de l'essai, « *Tours autogreffe, 2 bis bvd Tonnellé 37000 Tours* » auprès de la compagnie : *sham, 18 rue Edouard Rochet, 69372 Lyon* pour couvrir les risques liés à cette recherche. Toute information vous concernant recueillie pendant cet essai sera traitée de façon confidentielle.

Seuls les responsables de l'étude et éventuellement les autorités de Santé pourront avoir accès à ces données. A l'exception de ces personnes -qui traiteront les informations dans le plus strict respect du secret médical-, votre anonymat sera préservé. La publication des résultats de l'étude ne comportera aucun résultat individuel.

Confidentialité :

Pour s'assurer que vos données de santé demeurent confidentielles, les formulaires, dossiers et échantillons qui sont conservés seront étiquetés avec les trois premières lettres de votre nom et prénom. Ils ne seront pas étiquetés avec votre nom, votre photographie ou tout autre élément d'information permettant de vous identifier personnellement.

Conformément aux articles L.1121-3 et R.5121-13 du code de la santé publique, les personnes ayant un accès direct prendront toutes les précautions nécessaires en vue d'assurer la confidentialité des informations relatives à l'étude, votre identité et les différents résultats. Ces personnes sont soumises au secret professionnel.

Vous pourrez, en fin d'étude, si vous le désirez, prendre connaissance des résultats définitifs de notre travail.

Devenir des échantillons au décours de la recherche :

A la fin de l'étude, les échantillons biologiques résultant de votre prise en charge seront conservés dans une bio collection si vous en êtes d'accord. Cette bio collection a pour but de réaliser des recherches en oncologie médicale. Cette bio collection sera déclarée au Ministère de l'enseignement et de la recherche.

Vous pourrez changer d'avis à tout moment. Si, au cours de l'étude, vous souhaitez annuler votre consentement à l'utilisation de vos échantillons, vous devrez informer le médecin de l'étude que vous ne souhaitez plus que vos échantillons soient conservés ou utilisés pour la recherche. Tout échantillon encore disponible sera alors détruit. En cas de décès ou de perte de vos capacités, vos échantillons et les données vous concernant seront utilisées dans le cadre de la bio collection.

Si vous avez des questions pendant votre participation à cette étude, vous pourrez contacter le médecin responsable de l'étude, le Professeur Linassier, tél : 02-47-47-99-19.

Vous êtes libre d'accepter ou de refuser de participer à cette étude. Cela n'influencera pas la qualité des soins qui vous seront prodigués.

Nous vous remercions d'avoir pris le temps de lire cette lettre d'information. Si vous êtes d'accord pour participer à cette recherche, nous vous invitons à signer le consentement ci-joint.

Annexe 6 : Consentement

CONSENTEMENT POUR L'ANALYSE DES CARACTERISTIQUES GENETIQUES - Immunogénétique –

(À remplir en triple exemplaire : pour le patient, pour son dossier et pour le laboratoire)

Grâce aux progrès réalisés dans la connaissance du génome humain, il est désormais plus facile d'analyser l'ADN contenu dans les cellules. Cet ADN des chromosomes constitue le génome et détermine le patrimoine génétique d'un individu. Une analyse de l'ADN fournit donc des informations sur les **caractéristiques génétiques**.

Certaines de celles-ci peuvent prédisposer à la survenue d'une maladie, expliquer son évolution, ses caractéristiques, ou encore prédire la réponse à des traitements. Une meilleure connaissance de ces facteurs génétiques peut permettre une prise en charge de la maladie mieux adaptée au patient (traitement personnalisé).

Conformément aux arrêtés n°94-654 de la loi du 29 juillet 1994, toute analyse des caractéristiques génétiques nécessite de recueillir le consentement du patient.

Le laboratoire d'immunologie du CHRU de Tours (2 Bd Tonnellé, 37044 Tours Cedex 9) pratique des analyses génétiques en vue de mieux comprendre la variabilité des réponses immunitaires. Ces analyses portent sur des gènes dont les variations peuvent influencer l'activation ou le trafic des globules blancs, ou la réactivité des cellules des parois des vaisseaux.

Je soussigné(e), M., Mme, Mlle :

né(e) le :

demeurant :

- certifie avoir vu le Dr. qui m'a informé sur la nature des études qui seront effectuées

- donne mon accord pour que ces analyses génétiques soient effectuées sur un échantillon de mon sang.

- j'autorise également le recueil, la saisie et le traitement des données contenus dans mon dossier médical, dans le plus strict respect du secret médical.

- certifie avoir été informé que mon ADN sera stocké au laboratoire d'Immunologie du CHRU de Tours.

- certifie avoir pris connaissance que je peux à tout moment demander des informations complémentaires, rectifier ma position vis-à-vis de ces analyses ou demander que mon ADN soit détruit, simplement en contactant le laboratoire (2 Boulevard Tonnellé, 02-47-47-87-36),

Fait en triple exemplaire à, le

Signature du Patient

Signature du médecin prescripteur

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans 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 le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime
si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobre
et méprisé de mes confrères
si j'y manque.

FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

Marie-Agnès BY

84 pages, 14 figures, 12 tableaux

Etude du rôle pronostique des polymorphismes du VEGF dans le carcinome rénal métastatique à cellules claires

Résumé

Introduction : Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) joue un rôle fondamental dans la physiopathologie du carcinome rénal à cellules claires. Une cinquantaine de polymorphismes de nucléotide simple (SNP) ont été décrits pour le gène de VEGF. Le but de ce travail était d'étudier l'influence de certains SNPs du VEGF, ayant démontré une implication en pathologie tumorale, sur le pronostic du cancer du rein et la réponse aux différentes thérapeutiques anti-angiogéniques tels que le sunitinib, bevacizumab, temsirolimus, everolimus, sorafénib, axitinib et pazopanib.

Matériels et méthodes : Il s'agit d'une étude rétrospective, unicentrique portant sur 59 patients atteints d'un carcinome à cellules claires métastatique traité par anti-angiogéniques. Cinq SNPs du VEGF (-2549 D/I, -460 C/T, -1154 G/A, +405 G/C, +936 C/T) étaient analysés par deux techniques de PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism et PCR multiplex).

Résultats : La survie globale depuis le diagnostic était significativement meilleure chez les patients porteurs du SNP +936 C/C par rapport au SNP+936 C/T (médiane 77 mois vs 26 mois $p=0,021$). Cette augmentation de la survie globale était indépendante de la durée de la survie sans métastase mais était liée à une augmentation de la survie globale en phase métastatique et notamment la survie sans progression en 1^{ère} ligne de traitement. Les patients porteurs du SNP +936 C/C avait une survie globale métastatique de 67 mois vs 22 mois pour le SNP +936 C/T ($p=0,006$). Les autres SNPs n'avaient pas de valeur pronostique. Le polymorphisme +936 conservait une valeur pronostique indépendante du score de Heng en analyse multivariée tant sur la survie globale en phase métastatique que sur la survie sans progression. Par contre la survie globale depuis le diagnostic n'était pas corrélée au SNP +936.

Discussion et conclusion : Le polymorphisme +936 C/T semble avoir un rôle pronostique sur la survie dans le cancer du rein en phase métastatique. Il ne modifie pas la durée de la phase pré-métastatique mais semble influencer la durée de la période métastatique. Ce SNP pourrait modifier l'évolutivité de la maladie par une variabilité inter-individuelle de l'intensité de l'angiogénèse et la sensibilité aux traitements anti-angiogéniques.

Une étude confirmatoire sur un plus grand échantillon serait nécessaire pour confirmer ces résultats.

Mots clés : Carcinome rénal à cellules claires, métastases, VEGF, polymorphisme de nucléotide simple, facteur pronostique

Jury :

Président du Jury : Monsieur le Professeur Claude LINASSIER

Membres du jury : Madame le Professeur Gaëlle FROMONT-HANKARD

Monsieur le Professeur Claude LINASSIER

Monsieur le Professeur Franck BRUYERE

Madame le Docteur Valérie GOUILLEUX

Madame le Docteur Bérangère NARCISO

Date de soutenance : Mardi 24 Juin 2014