

UNIVERSITE PARIS XIII –SORBONNE PARIS NORD  
**École doctorale Sciences, Technologies, Santé Galilée**

**Génomique des métastases de cancer du rein: implications thérapeutiques**

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par

**Thi Oanh BUI**

Laboratoire INSERM UMRS\_942

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR EN SCIENCE**

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Soutenue le 15 Mars 2024

devant le jury d'examen constitué de :

Pr. Laurence ALBAGES, Présidente du jury

Pr. Nelly BURNICHON, Rapporteur

Pr. Nicolas PENEL, Rapporteur

Dr. Raphael MARGUERON, Examinateur

Dr. Laura GARDANO, Examinatrice

Pr. Guilhem BOUSQUET, Université Sorbonne Paris Nord, Directeur

Pr. LE Thi Huong, Université de Médecine de Ha Noï, Co-directrice

## Résumé

Les carcinomes à cellules rénales, aussi dits à cellules claires (ccRCC), sont des tumeurs malignes présentant un potentiel métastatique élevé, car plus de 50% des patients développent des métastases, soit au diagnostic initial ou lors de la rechute de la maladie. Les médicaments anti-angiogéniques et plus récemment les immunothérapies ont amélioré le pronostic des ccRCC métastatiques. Cependant, presque tous les patients développent une résistance à ces traitements, avec une survie médiane allant jusqu'à 30 mois. Les mécanismes de résistance restent largement à décrypter, mais l'hétérogénéité intra-tumorale pourrait expliquer certaines des résistances cliniques observées. L'hétérogénéité intra-tumorale des ccRCC a été caractérisée au niveau moléculaire dans les tumeurs primaires, avec des preuves d'une hétérogénéité spatiale sous-clonale. De plus, les métastases proviennent de clones agressifs sélectionnés qui ont acquis une résistance au traitement de première ligne avec certaines anomalies génétiques qui se propagent des tumeurs primaires aux métastases. Ces clones métastatiques, qui peuvent être minoritaires dans la tumeur primaire, sont précisément ceux sur lesquels des analyses génomiques doivent être effectuées pour guider de manière optimale les thérapies ciblées des ccRCC métastatiques. Il existe encore peu de données génomiques obtenues à partir d'échantillons métastatiques.

Dans ce travail de Thèse, nous avons effectué la première méta-analyse des données génomiques des ccRCC obtenues à partir de tumeurs primaires et de métastases, afin d'évaluer la prévalence des mutations géniques et des altérations du nombre de copies. Ensuite, nous avons caractérisé les ccRCC métastatiques grâce à des analyses du génome entier réalisées sur des échantillons métastatiques fixés au formol. En utilisant la technologie OncoScan<sup>TM</sup>, nous avons identifié plusieurs altérations inattendues, dont une mutation *NOTCH1* pL1575P que nous avons caractérisée à des fins translationnelles. En choisissant CB-103 conçu pour bloquer les formes actives dominantes de NOTCH1-ICD pour traiter des modèles de xénogreffes de ccRCC métastatiques, nous avons obtenu un fort effet antitumoral, en particulier lorsque ce médicament était associé au sunitinib. Le CB-103 fait actuellement l'objet d'essais cliniques de phase II pour le LAL-T réfractaire, les carcinomes adénoïdes kystiques avancés et les cancers du sein hormonorésistants, avec un profil de toxicité acceptable, et notre équipe clinico-biologique est entrain de mettre en place un essai de Phase I en deuxième ligne des ccRCCs métastatiques.

## **Abstract**

Clear-cell renal cell carcinomas (ccRCCs) are malignant tumors with high metastatic potential, since more than 50% of patients develop metastases, either at initial diagnosis or at the moment of disease relapse. Anti-angiogenic drugs and more recently immunotherapies, have improved the prognosis of metastatic RCCs. However, almost all patients develop resistance to these treatments, with a median survival up to 30 months. Resistance mechanisms remain largely to be deciphered, but intra-tumor heterogeneity may explain some of the clinical resistances observed. Intra-tumor heterogeneity of RCCs has been characterized at molecular level in primary tumors, with evidence of sub-clonal spatial heterogeneity. In addition, metastases derive from selected aggressive clones that have acquired resistance to first line treatment with some gene abnormalities that expand from primary tumors to metastases. These metastatic clones, which might be a minority in the primary tumor, are precisely those on which genomic analyses need to be done to optimally guide targeted therapies of metastatic RCCs. There are still limited genomic data obtained from metastatic samples.

In this thesis, we did the first meta-analysis on RCC genomic data obtained from primary tumours and metastases, to assess gene mutation and copy number alteration prevalence. After that we characterized metastatic RCCs through whole-genome analyses of metastatic formalin-fixed samples. Using OncoScan® technology, we identified several unexpected alterations including a pL1575P *NOTCH1* mutation that we intended to better characterize for translational purpose. Using CB-103 designed to block GSI-insensitive dominant active forms of NOTCH1-ICD to treat xenograft models of metastatic ccRCC, we achieved a strong antitumor effect, particularly when this drug was combined with sunitinib. CB-103 is currently being evaluated in phase II clinical trials for refractory LAL-T, advanced adenoid cystic carcinomas and hormone-resistant breast cancers, with acceptable toxicity profile. This work opens the way for further clinical trials in patients with metastatic ccRCCs.

## **Remerciements**

Je voudrais tout d'abord remercier grandement le Professeur Guilhem BOUSQUET, mon directeur de thèse, qui m'a encadrée tout au long de cette thèse. Je voudrais aussi remercier pour sa gentillesse, sa bienveillance, sa disponibilité et son accompagnement. C'est un grand plaisir d'apprendre et de travailler à vos côtés.

Je remercie le Professeur LE Thi Huong, ma directrice de thèse au Viet Nam, pour son accompagnement et son soutien.

Je remercie également Monsieur DAO Van Tu, directeur du département de recherche translationnelle à l'hôpital national du cancer du Viet Nam, qui a fait une collaboration depuis plus de cinq ans avec l'unité de recherche UMR-S942, dans la cadre de la thèse en cotutelle internationale, qui m'a aidé et m'a soutenue durant ma thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Je tiens à remercier le Professeur Laurence ALBIGÈS, qui me fait l'honneur d'être la Présidente du Jury de cette thèse.

Je remercie les Professeurs Nelly BURNICHON et Nicolas PENEL d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma Thèse.

Je remercie les Docteurs Raphael MARGUERON et Laura GARDANO d'avoir accepté d'être examinateurs de ma Thèse

Je remercie bien entendu l'ensemble des membres de l'unité UMR\_S942 pour leur gentillesse et leur accueil toutes ces années.

Enfin, un immense merci à ma famille qui ont supporté mes absences répétées pour me permettre de mener à bien ce projet.

## Table des matières

Résumé .....	2
Abstract.....	3
Remerciements.....	4
Table des figures .....	8
Tableaux .....	10
Liste des abréviations (dans l'ordre alphabétique) .....	11
<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>12</b>
<b>1. Epidémiologie et traitements des métastases de cancer du rein .....</b>	<b>12</b>
<i>1.1. Epidémiologie du cancer du rein.....</i>	<i>12</i>
<i>1.2. Facteurs de risque.....</i>	<i>12</i>
<i>1.3. Classification anatomopathologique.....</i>	<i>16</i>
<i>1.4. Physiopathologie des ccRCCs et classification moléculaire .....</i>	<i>18</i>
<i>1.5. Traitement systémique .....</i>	<i>21</i>
Thérapies ciblées .....	21
Immunothérapies .....	25
<b>2. Génomique du cancer du rein et méthodes d'analyses fonctionnelles du génome .....</b>	<b>28</b>
<b>II. DOMAINE DE RECHERCHE .....</b>	<b>37</b>
<b>1. Pour les carcinomes à cellule rénale de type ccRCC, y a-t-il une signature propre aux localisations métastatiques par rapport aux tumeurs primitives? .....</b>	<b>37</b>
<i>1.1. Matériel et méthodes .....</i>	<i>37</i>
Stratégie de recherche et critères de sélection.....	37
Critères d'éligibilité .....	37
Stratégie de recherche .....	39
Sélection des études .....	40
Protocole et enregistrement.....	40
Évaluation de la qualité .....	40

Analyse statistique.....	40
<b>1.2. Résultats .....</b>	<b>41</b>
Sélection des études, caractéristiques et évaluation de la qualité .....	41
Profil mutationnel des ccRCCs primitifs .....	58
Certaines mutations « se propagent » dans les métastases du RCC.....	68
Pertes d'hétérozygotie (LOH) et altérations du nombre de copies (CNA) dans les ccRCCs primitifs et les métastases.....	72
<b>1.3. Discussion et conclusion.....</b>	<b>73</b>
<b>2. Peut-on identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour les carcinomes à cellules rénales de type cellules claires métastatiques? .....</b>	<b>80</b>
<b>2.1. Matériel et méthodes .....</b>	<b>80</b>
Échantillons métastatiques de patients traités pour l'analyse OncoScan™ .....	80
Purification de l'ADN et analyse du génome entier sur des échantillons humains .....	80
ddPCR and validation of the NOTCH1 mutation in metastatic samples .....	81
Détection de cellules cancéreuses exprimant NOTCH1-ICD dans les métastases et les xénogreffes tumorales .....	82
Xénogreffes de carcinome à cellules claires à cellules claires dérivées du patient et traitement.....	83
Évaluation <i>in situ</i> de la nécrose, de la prolifération cellulaire, de l'angiogenèse et de l'apoptose.....	85
Analyse statistique.....	85
<b>2.2. Résultats .....</b>	<b>86</b>
Signature du génome entier des quatre métastases de ccRCC à l'aide de la technologie OncoScan® .....	86
La mutation pL1575P_c4724T_C de <i>NOTCH1</i> est un événement moléculaire fréquent dans les métastases de ccRCC.....	90
La mutation pL1575P de <i>NOTCH1</i> est une mutation activatrice.....	91

La mutation <i>NOTCH1</i> pL1575P est fréquemment retrouvée dans les xénogreffes de ccRCC obtenues à partir d'échantillons métastatiques humains .....	95
Le ciblage spécifique de NOCH1-ICD inhibe la croissance tumorale <i>in vivo</i> .....	95
<b>2.3. Discussion et conclusion.....</b>	<b>101</b>
<b>III. PERPECTIVES .....</b>	<b>104</b>
<b>IV. BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>107</b>
<b>V. ANNEXE .....</b>	<b>145</b>

## Table des figures

Figure 1. Thérapie ciblée pour les RCCs métastatiques.....	22
Figure 2. Traitement systémique de première intention du ccRCCs métastatiques[69] .....	26
Figure 3. Principe de la technologie d’OncoScan™ (adapté d’Affymetrix®).....	35
Figure 4. PRISMA flowchart for the screening and selection of the studies.....	39
Figure 5. Qualité des études .....	49
Figure 6. Ce diagramme ou « forest-plot » montre la prévalence des mutations de VHL dans les études en fonction de la méthode de détection utilisée, et objective une grande hétérogénéité de résultats entre les études.....	59
Figure 7. Prévalence cumulée des mutations dans les tumeurs primitives et les métastases de 14696 patients avec un ccRCC .....	71
Figure 8. Prévalence cumulée des mutations dans les tumeurs primitives et les métastases appariées de 107 patients atteints de ccRCCs métastatiques .....	71
Figure 9. Prévalence cumulée des LOH et des CNA dans les tumeurs primitives et les métastases de 14696 patients avec un ccRCC.....	73
Figure 10. Principales altérations géniques et voies de signalisation impliquées dans la carcinogenèse du ccRCC.....	74
Figure 11. Coefficient d’inhibition de la croissance tumorale dans les modèles XRCC .....	84
Figure 12. Gains et pertes de nombre de copies dans 4 échantillons de ccRCC métastatiques à l'aide d'Oncoscan™ .....	87
Figure 13. Discrimination allélique en ddPCR pour la mutation NOTCH1 pL1575P_c4724T_C, dans 3 des 4 échantillons métastatiques traités par analyse Oncoscan™ (A), et dans dix échantillons métastatiques supplémentaires (B). .....	91
Figure 14. Structure de la protéine NOTCH1 et voie de signalisation. ....	92
Figure 15. Cellules cancéreuses et cellules endothéliales tumorales exprimant NOTCH1-ICD dans des échantillons humains. ....	94

Figure 16. Discrimination allélique ddPCR pour la mutation NOTCH1 pL1575P_c4724T_C dans 5 xénogreffes tumorales XRCC au premier (en gris) et au cinquième (en noir) passages.	95
Figure 17. Réponse au traitement par sunitinib pour les deux patients ayant fourni des échantillons métastatiques pour les modèles de xénogreffes .....	96
Figure 18. La croissance de tumeurs traitées par le LY411575 en monothérapie, le sunitinib en monothérapie (n = 6 par groupe de traitement).....	98
Figure 19. Effet anti-tumoral in vivo du CB-103 dans un modèle de xénogreffe XRCC4.....	100
Figure 20. Effet antitumoral in vivo du CB-103 dans le modèle de xénogreffe XRCC5. ....	101
Figure 21. Programme d'études .....	106

## Tableaux

Tableau 1. Évaluation du risque pour le carcinome rénal métastatique selon l'IMDC .....	20
Tableau 2. Résumé des principaux avantages et inconvénients des technologies les plus couramment utilisées pour l'analyse fonctionnelle du génome et de l'épigénome .....	29
Tableau 3. Principales caractéristiques des 93 études incluses dans la méta-analyse.....	42
Tableau 4. Détails sur les scores de qualité des études incluses, basés sur l'outil Q-genie.....	50
Tableau 5. Prévalence des mutations dans les ccRCC primitifs .....	60
Tableau 6. Prévalence des mutations les plus fréquentes dans les ccRCC primitifs selon les analyses en sous-groupes .....	63
Tableau 7. Prévalence des mutations courantes dans les ccRCCs primitifs selon les analyses de sous-groupes, mais restreintes aux 42 articles de qualité élevée.....	66
Tableau 8. Prévalence des mutations dans les métastases de ccRCCs.....	69
Tableau 9. Caractéristiques des quatre patients inclus dans l'étude initiale utilisant la technologie Oncoscan <sup>TM</sup> .....	86
Tableau 10. Mutations ponctuelles identifiées dans les métastases de 4 ccRCCs avant le traitement.....	88
Tableau 11. Thérapies ciblées de NOTCH1.....	97
Tableau 12. Coefficient d'inhibition de croissance pour les médicaments testés dans les modèles XRCC4 et XRCC5 .....	99

## Liste des abréviations (dans l'ordre alphabétique)

aCGH	:	Array comparative genomic hybridization
ATAC-seq	:	Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing
ccRCC	:	Clear-cell renal cell carcinoma
CNA	:	Copy number Alteration
ChIP-seq	:	Chromatin immunoprecipitation sequencing
chRCC	:	chromophobe renal cell carcinoma
dd-PCR	:	Digital droplet polymerase chain reaction
FISH	:	Fluorescence in situ hybridization
GSI	:	$\gamma$ secretase inhibitor
IC	:	Intervalle de confiance
LOH	:	Loss of Heterozygosity
MRE-seq	:	Methylation Restriction Enzyme sequencing
pRCC	:	papillary renal cell carcinoma
RCC	:	renal cell carcinoma
RR	:	risque relatif
RT-PCR	:	Real-time polymerase chain reaction
SAGE	:	Serial analysis of gene expression
Targeted NGS	:	Targeted next generation sequencing
TMB	:	Tumor mutational burden
TSM	:	Le taux d'incidence standardisé monde
ITK	:	Inhibiteur de tyrosine kinase

## I. INTRODUCTION

### 1. Epidémiologie et traitements des métastases de cancer du rein

#### 1.1. *Epidémiologie du cancer du rein*

Selon le rapport de GLOBOCAN en 2020, le nombre de nouveaux cas de cancers du rein dans le monde est estimé à 431288, représentant 2,4% de l'ensemble des cancers et se classant au 14<sup>ème</sup> rang parmi les cancers dans le monde, dont environ 180000 décès par cancer du rein. En 2018, on estimait à 15300 nouveaux cas de cancers du rein en France. La plupart des cas de cancer du rein sont détectés de manière fortuite lors d'une imagerie faite pour une autre raison, et la survie dépend fortement du stade du diagnostic avec seulement un taux de survie à 5 ans de 12 % pour les formes métastasées [1].

L'incidence des cancers du rein présente une variation géographique, étant plus élevée dans les pays développés [1]. Cette augmentation de l'incidence chez les hommes et dans les pays développés est due à plusieurs facteurs. Parmi ceux-ci, on peut mentionner des facteurs génomiques, des expositions professionnelles et environnementales telles que le tabagisme.

#### 1.2. *Facteurs de risque*

**Le sexe :** Le taux d'incidence standardisé monde (TSM) chez les hommes est environ deux fois plus élevé que chez les femmes. Sur l'ensemble des nouveaux cas de cancer du rein, environ 254500 cas sont diagnostiqués chez les hommes et 148800 chez les femmes, avec un risque relatif (RR) d'environ 1,7 pour les hommes par rapport aux femmes. Le risque cumulé mondial de développer la maladie est de 0,69 % chez les hommes et de 0,35 % chez les femmes, ce qui se traduit par un taux d'incidence standardisé mondial (TSM) de 6,1 et 3,2 respectivement chez les hommes et les femmes (la moyenne mondiale étant de 4,4) [2]. La raison pourrait être que les hommes ont un mode de vie comportant davantage de facteurs de risque de cancer par rapport aux femmes (comme le tabagisme et la consommation d'alcool, par exemple). Les femmes sont généralement moins souvent diagnostiquées avec un carcinome à cellules rénales de type papillaire (pRCC) et davantage avec un carcinome à cellules rénales de type chromophobe (chRCC), bien que les causes ne soient pas encore claires.

**L'âge :** Le taux de cancer du rein augmente avec l'âge, le groupe d'âge le plus touché étant de 65 à 74 ans [3].

**L'ethnie :** Aux États-Unis, les afro-Américains, les hispaniques et les amérindiens ont un risque accru de développer un cancer du rein par rapport aux américains blancs. Une étude rétrospective a montré que les hispaniques avaient près de trois fois plus de risques d'être diagnostiqués précocement avec un cancer du rein, tandis que les amérindiens avaient un risque six fois plus élevé, en particulier pour le sous-type de cancer du rein à cellules claires. De plus, parmi les hispaniques, le fait de parler espagnol comme langue principale est associé à une augmentation du risque de diagnostic du cancer du rein à un stade avancé [4]. Bien que les afro-américains soient souvent diagnostiqués avec un cancer du rein à un stade plus précoce par rapport aux américains blancs [5], leur taux de survie tend à être moins favorable [6,7]. Une étude a révélé que parmi les patients atteints de cancer du rein de stade T1, les afro-américains étaient plus susceptibles d'avoir une chirurgie « classique » par rapport à une chirurgie assistée par robot [8]. Le sous-type de cancer du rein à cellules rénales/cellules claires est plus fréquent chez les américains blancs, en partie en raison d'un risque accru de maladie de Von Hippel-Lindau (VHL), tandis que le sous-type papillaire est plus fréquent chez les afro-américains et les caribéens [9]. Des facteurs tels que le niveau d'éducation, le statut socio-économique, les habitudes alimentaires, le manque d'activité physique, les conditions de vie défavorables, l'accès aux soins de santé limité et le suivi médical inadéquat ont été suggérés comme base des différences raciales dans le diagnostic et le taux de survie du cancer du rein au sein des groupes minoritaires [7].

#### ***La nutrition et le comportement :***

Une alimentation contenant en moyenne 62,7 g de viande rouge/jour pour 1000 kcal présente un risque accru de développer un cancer du rein, avec un HR de 1,19 (IC à 95 %, 1,01-1,40) par rapport au groupe consommant en moyenne 9,8 g [10]. Cette corrélation n'a été observée que chez les femmes dans une autre étude prospective, avec un risque de 2,03 (IC à 95 %, 1,14-3,63) pour le groupe consommant plus de 80 g de viande rouge par jour par rapport à celui en consommant moins de 10 g [11].

La consommation de fruits et de légumes (en particulier les légumes crucifères) a été associée à une réduction du risque de cancer du rein [12,13]. Cependant, aucune corrélation significative n'a été trouvée entre la consommation de fruits ou de légumes et le risque de cancer du rein dans l'étude EPIC (HR 1,03; IC à 95 %, 0,97-1,08 et HR 0,97 ; IC à 95 %, 0,85-1,11, respectivement) malgré des niveaux variables de consommation [14]. De même, dans l'étude VITAL, aucune

corrélation significative n'a été observée entre la consommation de fruits ou de légumes et le risque de cancer du rein (HR 1,02; IC à 95 %, 0,71-1,46 et HR 0,76; IC à 95 %, 0,52-1,11, respectivement) [15].

Une consommation quotidienne moyenne élevée de sodium (3,4 g chez les hommes et 2,8 g chez les femmes), favorisant probablement le développement d'une hypertension artérielle, est associé à un risque augmenté de cancer du rein avec un HR de 1,40 (IC à 95 %, 0,99-1,97) par rapport à une consommation de 1,9 g chez les hommes et 1,5 g chez les femmes [16].

D'autre part, de plus en plus de preuves suggèrent que le café peut prévenir certaines maladies chroniques, y compris le cancer et les maladies métaboliques, le café étant l'une des boissons les plus largement consommées dans le monde. Le cafestol et la kahwéol sont des diterpènes naturels extraits des grains de café et ont été démontrés comme ayant de nombreuses propriétés biologiques, y compris des activités anti-inflammatoires, anti-angiogéniques et anti-tumorales [17]. Des tests récents en laboratoire ont révélé que le cafestol acétate et la kahwéol acétate ont des propriétés anti-prolifératives et anti-migratoires dans les cellules cancéreuses du rein humain [18], ainsi que des propriétés anti-angiogéniques dans les cellules endothéliales de microvaisseaux humains. Par conséquent, certains composés du café peuvent avoir des propriétés anticancéreuses.

### ***Le tabagisme***

Le tabagisme est associé à de nombreux cancers courants, dont le cancer du rein. La fumée de tabac contient un mélange de substances cancérigènes impliquées dans la carcinogénèse du cancer du rein [19]. Les preuves épidémiologiques de la relation causale avec le tabagisme comprennent une relation dose-incidence entre le risque et la quantité de tabac fumé par jour, ainsi qu'une réduction du risque après avoir arrêté de fumer pendant une période prolongée. Aux États-Unis, l'étude VITAL a montré qu'un tabagisme de plus de 22,5 paquet-année avaient un risque accru de cancer du rein de plus de 50 % par rapport aux non-fumeurs [15]. Une analyse regroupant plus de 24 articles récents a révélé un RR global de 1,31 (IC à 95 %, 1,22-1,40) pour le risque de cancer du rein chez tous les fumeurs, et de 1,16 (IC à 95 %, 1,08-1,25) chez les anciens fumeurs [20]. Un récent rapport de l'étude prospective du centre de recherche sur la santé publique au Japon (étude JPHC) a montré que les gros fumeurs ( $\geq 40$  paquet-année) avaient un risque accru de cancer du rein (HR 1,50; IC à 95 %, 1,01-2,25), bien que l'impact du tabagisme sur l'incidence de cancer du rein n'ait pas été bien étudié chez les asiatiques [21].

**L'obésité :** L'étude VITAL a montré que l'obésité est significativement liée au risque de cancer du rein (IMC  $\geq$  35 par rapport à < 25 kg/m<sup>2</sup>; HR 1,71; IC à 95 %, 1,06-2,79) [11]. L'estimation du RR correspondant à une augmentation d'environ 5 kg de poids corporel augmente le risque de cancer du rein de 25 % chez les hommes et de 35 % chez les femmes. Une autre étude a rapporté que non seulement les personnes âgées, mais aussi les hommes jeunes présentent un risque accru de développer un cancer du rein, avec un HR de 2,43 (IC à 95 %, 1,54-3,83) dans le groupe ayant un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 27,5 kg/m<sup>2</sup> par rapport au groupe témoin ayant un IMC inférieur à 22,5 kg/m<sup>2</sup> [22]. Les hommes ayant un IMC  $\geq$  27 kg/m<sup>2</sup> ont un HR de 1,99 (IC à 95 %, 1,04-3,81) pour le risque de cancer dans l'étude JPHC, par rapport à un IMC compris entre 23 et 24,9 kg/m<sup>2</sup>. En revanche, pour les femmes en surpoids, le surrisque de cancer du rein n'est pas statistiquement significatif (IMC  $\geq$  25 par rapport à 21-24 kg/m<sup>2</sup>; HR 1,55; IC à 95 %, 0,76-3,18) [23].

#### ***L'hypertension artérielle :***

L'hypertension artérielle est indépendamment liée au risque de cancer du rein (HR 1,70; IC à 95%, 1,30-2,22) [15], et des preuves ont été rapportées que l'hypertension artérielle est une cause associée au cancer du rein. Une analyse récente combinant 18 études prospectives dans l'étude VITAL a confirmé la relation positive entre l'hypertension artérielle et le risque de cancer du rein. Les antécédents d'hypertension artérielle sont associés à une augmentation de 67% du risque de cancer du rein, et chaque augmentation de 10 mmHg de la pression artérielle augmente le risque de cancer du rein de 10 à 22%. Les mécanismes biologiques sous-jacents de la relation entre l'hypertension artérielle et le cancer du rein ne sont pas encore clairement compris, mais des hypothèses ont été avancées, notamment en lien avec une hypoxie chronique rénale et une peroxydation lipidique due à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [24]. A l'opposé, l'utilisation efficace de médicaments antihypertenseurs notamment inhibiteurs du système rénine-angiotensine (RAS) ont possiblement un effet anti-tumoral bénéfique [25]. On estime également que les patients hypertendus traités par inhibiteurs du RAS pourraient avoir un effet préventif sur la survenue de cancer du rein, mais aussi un bénéfice sur la prolongation significative de la survie après le traitement chirurgical du cancer du rein [26,27].

#### ***Les antécédents de diabète de type 2 :***

Le diabète de type 2 est associé à un risque accru de plusieurs types de cancer, mais sa relation avec le cancer du rein reste encore floue. Cette association n'a pas été observée dans l'étude

VITAL [15], tandis que l'étude Nurses' Health a montré une association significative entre le diabète de type 2 et un risque accru de cancer du rein chez les femmes (HR 1,60; IC à 95%, 1,19-2,17) [28]. Une concentration élevée de glucose chez les hommes pourrait également être associée à un risque accru de cancer du rein (HR 3,75; IC à 95%, 1,46-9,68) [29]. De plus, une analyse combinée de 9 études de cohorte a révélé une relation entre le diabète et le risque de cancer du rein (RR 1,42; IC à 95 %, 1,06-1,91), avec un risque plus élevé chez les femmes (RR 1,70; IC à 95 %, 1,47-1,97) par rapport aux hommes (RR 1,26 ; IC à 95 %, 1,06-1,49).

#### ***Les antécédents familiaux :***

Les antécédents familiaux de cancer sont un facteur de risque pour le cancer du rein, en particulier en raison de certaines mutations génétiques spécifiques telles que Von Hippel-Lindau (VHL), fumarate hydratase et succinate dehydrogenase B, qui ont été évaluées comme étant liées au risque de cancer du rein [30].

Une étude longitudinale du système de santé public suédois a montré que les patients atteints de cancer du rein ayant des antécédents familiaux de cancer ont un risque 4,58 fois plus élevé (IC à 95 %, 2,87-6,94) de cancer du rein et peuvent également développer d'autres types de cancer après le diagnostic initial du cancer du rein [8].

#### ***1.3. Classification anatomopathologique***

Le cancer du rein comprend une gamme de types histologiques décrits dans la classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en 2016 [31]. Il existe trois principaux sous-types histologiques de cancers du rein: à cellules rénales ou dits à cellules claires (ccRCC), papillaire (pRCC de type I et II) et chromophobe (chRCC). Le diagnostic histologique inclut, en plus du sous-type histologique, l'évaluation du grade nucléaire, la présence d'une composante sarcomatoïde, la présence d'un envahissement vasculaire notamment de la veine rénale, la présence de nécrose tumorale, l'existence d'un envahissement de la graisse péri-rénale. Le rapport doit préciser la classification pT ou pN. Le système de classification WHO/ISUP (Association internationale de pathologie urologique) à quatre niveaux a remplacé le système de classification de Fuhrman pour le grade histo-pronostique [32].

#### ***Carcinome à cellule rénale dits à cellules claires (ccRCC)***

Il s'agit du sous-type histologique le plus fréquent (> 80%). En général, le cancer du rein à cellules claires (ccRCC) est bien circonscrit et n'a généralement pas de capsule. A la coupe, il présente une couleur jaune chamois, souvent avec des signes hémorragiques et de la nécrose.

La perte du chromosome 3p et les mutations du gène Von Hippel-Lindau (*VHL*) sur le chromosome 3p25 sont fréquemment observées. La perte de la fonction de la protéine Von Hippel-Lindau contribue à l'initiation, à la progression et probablement au processus métastatique. Le chromosome 3p contient au moins quatre gènes suppresseurs de tumeurs additionnels du ccRCC (*UTX, JARID1C, SETD2, PBRM1*) [31]. En général, le ccRCC a un pronostic moins favorable que le pRCC et le chRCC.

#### ***Carcinome à cellule rénale de type papillaires (pRCC)***

Le cancer du rein à cellules papillaires est le deuxième sous-type histologique le plus fréquent (10-15%). Le cancer du rein à cellules papillaires se décline en deux types, I et II, qui sont cliniquement et biologiquement distincts. Le pRCC de type I est associé aux mutations germinales activatrices de l'oncogène *MET*, tandis que le pRCC de type II est associé à l'activation de la voie NRF2-ARE et présente au moins trois sous-groupes. Le pRCC de type II représente un groupe de tumeurs hétérogènes et devrait être stratifié à l'avenir, par exemple, en sous-types de cancers du rein papillaire [31].

#### ***Carcinome à cellule rénale de type chromophobe (chRCC)***

Généralement, le cancer du rein à cellules chromophobes (chRCC) est une masse de couleur brun pâle, relativement homogène et solide, avec des limites nettes et sans capsule. Le cancer du rein à cellules chromophobes ne peut pas être classé selon le système de classification de Fuhrman car il ne présente pas de caractéristiques nucléaires bénignes typiques. Un système de classification alternatif a été proposé mais n'a pas encore été validé. Les pertes de chromosomes Y, 1, 2, 6, 10, 13, 17 et 21 sont des altérations génétiques courantes [31]. Le pronostic est généralement bon [33]. Les taux de survie sans récidive à 5 et 10 ans sont respectivement de 94,3% et 89,2%. La récidive de la maladie survient seulement chez 5,7 % des patients, 76,5 % d'entre eux développant des métastases à distance, la localisation métastatique la plus fréquente étant osseuse. La récidive et la mortalité après une chirurgie de chRCC localisée sont donc faibles.

Pour les lésions < pT2a sans nécrose hémorragique ni composante sarcomatoïde, le pronostic est plus favorable [34]. Le nouveau système de classification WHO/ISUP regroupe les entités précédentes en tumeur à cellules claires papillaire et chRCC.

#### ***1.4. Physiopathologie des ccRCCs et classification moléculaire***

Au cours de la dernière décennie, notre compréhension de la biologie et de la physiopathologie du ccRCC s'est considérablement améliorée, permettant de développer de nouvelles approches thérapeutiques.

Les carcinomes à cellules claires, qui ont généralement une délétion du chromosome 3p, se développent dans le tubule proximal [35,36]. Dans les formes sporadiques, la carcinogenèse des ccRCCs est spécifiquement associée au gène von Hippel-Lindau (*VHL*). Étant donné que le carcinome à cellules claires est le sous-type le plus courant du RCC, de nombreux travaux ont été réalisés pour classer ces cancers en fonction des altérations génétiques.

##### *Les altérations chromosomiques*

Les altérations courantes des ccRCCs au niveau chromosomal comprennent les éléments suivants [37]:

- Perte du 3p (91 à 94%), qui contient plusieurs gènes associés au ccRCC, notamment le gène *VHL*, le gène associé à la protéine BRCA1 (*BAP1*) et le gène de la protéine polybrome 1 (*PBRM1*).
- Gain du 5q (67 à 69%).
- Monosomie ou perte partielle du 14q (42 à 45%).
- Gain du 7q (20%).
- Perte du 8p (32%).
- Perte du 9p (29%).

Plusieurs altérations spécifiques des gènes et des voies décrites dans le ccRCC sont discutées ci-dessous :

- *VHL* est un gène suppresseur de tumeur situé sur le chromosome 3p, variablemement inactif selon les études. La protéine VHL est reconnue par le complexe E3 ligase, comprenant TCEB1 et CUL2 [38]. Le complexe VHL cible les sous-unités α des facteurs induits par l'hypoxie (HIF), HIF1α et HIF2α, pour permettre leur dégradation médiée par l'ubiquitine dans la voie du protéasome [39]. En cas d'inactivation de *VHL* (mutation,

perte 3p, hyperméthylation du promoteur) ou de mutation des membres du complexe *VHL*, *HIF1α* s'accumule dans le cytoplasme et forme des hétérodimères avec *HIF1β* [39]. Ce complexe *HIF1α* -*HIF1β* agit alors comme un facteur transcriptionnel activant la transcription de tout un ensemble de gènes dont des gènes pro-angiogéniques, le premier d'entre eux *VEGFA*. Cette inactivation de la voie *VHL* explique l'hypervasculisation des ccRCCs et le développement des anti-angiogéniques dans le traitement de ces tumeurs.

- Les trois autres gènes les plus fréquemment mutés, *PBRM1*, *SETD2* et *BAP1*, sont également situés sur le chromosome 3p. Tous les trois sont des modificateurs chromatiniens, contribuant à la réparation de l'ADN et à la régulation transcriptionnelle. Ce sont des événements précoces de la cancérogenèse du ccRCC, et leur perte favorise l'instabilité génétique. Les mutations de *BAP1* et *PBRM1* sont généralement exclusives [40]. *PBRM1* code pour la sous-unité BAF180 ciblant la chromatine dans le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF dépendant de l'ATP, impliqué dans la prolifération, la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN [41]. Outre le remodelage de la chromatine, les modifications des histones pourraient également jouer un rôle essentiel [42]. *SETD2* (domaine SET contenant la protéine 2) est une méthyltransférase responsable de la triméthylation des résidus lysine 36 sur l'histone H3 (c'est-à-dire H3K36me3), elle-même impliquée dans la régulation de la transcription et la médiation de la réparation des dommages à l'ADN [43]. *BAP1* est une enzyme dé-ubiquitinante de localisation nucléaire qui agit comme un suppresseur de tumeur : sa fonction est de dé-ubiquitinier le régulateur transcriptionnel HCF1 impliqué dans le remodelage de la chromatine, la régulation des facteurs de transcription de la famille E2F et la régulation du cycle cellulaire en aval. Par conséquent, la perte de *BAP1* conduit à la prolifération cellulaire et à la tumorigenèse [44].
- *TP53* : Le développement des ccRCCs peut également impliquer des anomalies dans les gènes qui contrôlent la division cellulaire. Cela inclut les gènes de la famille Ras et le gène suppresseur de tumeur *TP53*. Bien que les variants pathogènes du gène *TP53* soient identifiés rarement dans les ccRCCs, une surexpression de la protéine p53 est détectée dans environ la moitié des tumeurs [45]. La surexpression de p53 peut être associée à un comportement plus agressif et à un mauvais pronostic [45]. Notre équipe avait précédemment rapporté une augmentation de la prévalence des mutation du gène *TP53*

dans les ccRCC métastatiques par rapport aux ccRCC primitifs, et que le clone *TP53*-muté pouvait être minoritaire dans la tumeur primitive et s'expandre dans la métastase mais aussi contribuer ainsi à la prise de greffe dans un modèle murin [46].

#### *Stratification des risques et algorithme de traitement du ccRCC métastatique*

La thérapie systémique pour le carcinome rénal métastatique (mRCC) a évolué considérablement au cours des deux dernières décennies. Le risque individuel de progression et de décès d'un patient peut être estimé selon la classification de l'International Metastatic RCC Database Consortium (IMDC), désormais la plus utilisée [47]. Le modèle inclut 2 facteurs cliniques et 4 paramètres biologiques pour stratifier les patients atteints d'un carcinome rénal métastatique (mRCC) en trois sous-groupes : bon, intermédiaire et mauvais pronostic (Tableau 1) [47,48].

*Tableau 1. Évaluation du risque pour le carcinome rénal métastatique selon l'IMDC*

---

#### **Facteurs de risque de l'IMDC**

---

- 1 Index de Karnofsky <80%
  - 2 Délai entre le diagnostic et le début du traitement systémique < 1 an
  - 3 Taux d'hémoglobine < niveau normal bas [LNL]
  - 4 Taux de calcium corrigé > niveau normal supérieur [UNL]
  - 5 Taux de plaquettes > niveau normal supérieur [UNL]
  - 6 Taux de polynucléaires > niveau normal supérieur [UNL]
- 

#### **Profil de risque**

---

- 1 Bon pronostic : 0 facteur
  - 2 Pronostic intermédiaire : 1-2 facteurs
  - 3 Mauvais pronostic :  $\geq 3$  facteurs
- 

Les patients ne présentant aucun de ces facteurs négatifs ont un bon pronostic et peuvent atteindre une survie médiane plus longue d'environ 43 mois; les patients présentant 1 ou 2 facteurs ont un

risque intermédiaire de décès, avec une survie globale médiane d'environ 23 mois; les patients présentant 3 facteurs ou plus ont un pronostic défavorable attendu, avec une survie médiane d'environ 8 mois [47].

### ***1.5. Traitement systémique***

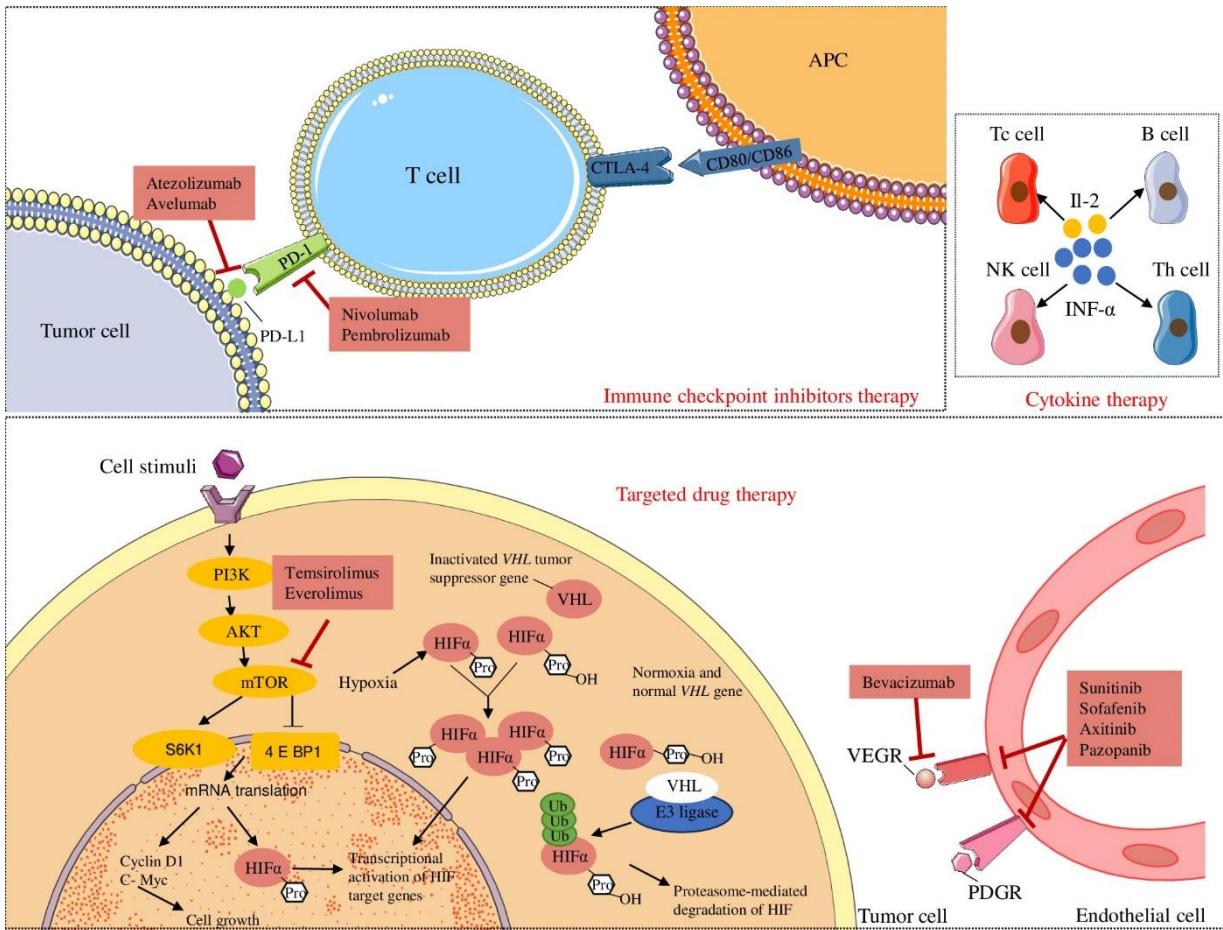
Les traitements systémiques (immunothérapie, thérapie ciblée), en complément de la chirurgie, ont un rôle essentiel dans la prise en charge des stades métastatiques, et possiblement dans les stades localisés à haut risque de récidive.

#### **Thérapies ciblées**

Nous l'avons vu, une large majorité des cancers du rein sont des cancers à cellules claires (ccRCC). Chaque sous-type histologique de cancer du rein présente des altérations génétiques spécifiques [49]. Au cours de la dernière décennie, notre compréhension de la biologie et de la physiopathologie du carcinome à cellules rénales (RCC) s'est considérablement améliorée. L'aperçu du processus de la maladie nous a aidés à développer de nouvelles approches thérapeutiques pour le ccRCC.

Les connaissances initiales sur la biologie moléculaire des cancers à cellules claires du rein proviennent de recherches sur la maladie de Von Hippel-Lindau (VHL). La maladie VHL se caractérise par le développement de tumeurs bénignes du cervelet et de la moelle épinière, de tumeurs des vaisseaux rétiniens, de tumeurs rénales et de kystes rénaux. Chez les patients atteints d'une maladie VHL (et donc ayant une mutation germinale du gène *VHL*), le risque de ccRCC est de 40 à 60 %. Les analyses génétiques des ccRCCs liés à VHL ont montré des pertes d'hétérozygotie au niveau de la région *VHL* sur le chromosome 3p25. Ces mêmes anomalies sont d'ailleurs présentes dans environ 75 à 80 % des formes sporadiques de ccRCCs. La perte de VHL, on la vu plus haut, est la base de la carcinogénèse rénale et du développement des ITK anti-angiogéniques, ciblant la voie du VEGFA (Figure 1).

En parallèle, un autre mécanisme de la carcinogénèse commun à la plupart cancers, est l'échappement à l'immunité [50], qui a conduit aux développements des immunothérapies dans le traitement du ccRCC (Figure 1), mais aussi des formes non à cellules rénales [51].



*Figure 1. Thérapie ciblée pour les RCCs métastatiques*

Les « anti-angiogéniques » sont largement utilisés en combinaison avec l’immunothérapie ou en monothérapie dans le traitement du cancer du rein. Certains des médicaments utilisés comprennent :

- Les inhibiteurs multi-cibles de récepteurs à activité tyrosine kinase (principalement récepteurs du VEGF VEGFR1/R2, et récepteur du PDGF PDGFRalpha/beta), tels que cabozantinib, pazopanib, sunitinib, axitinib, lenvatinib, sorafenib et tivozanib.
- Bevacizumab, un anticorps monoclonal ciblant le VEGF libre.

L’efficacité du pazopanib a été initialement démontrée dans un essai de phase III comprenant 435 patients randomisés pour recevoir soit du pazopanib, soit un placebo [52]. Par rapport au placebo, le pazopanib a montré une amélioration statistiquement significative du taux de survie sans progression (SSP) médian (9 mois par rapport à 4 mois, risque de rechute HR 0,46, IC à 95%, 0,34-0,62), mais aucune amélioration significative de la survie globale (SG) (SG médiane de 23 mois par rapport à 21 mois, risque de décès HR 0,91; IC à 95 % 0,71-1,16).

Le sunitinib, chef de file de cette classe et sans doute le plus puissant pharmacologiquement en termes d'inhibition du VEGFR2, est un ITK qui cible le VEGFR ainsi que d'autres tyrosines kinases liées au récepteur PDGF et au gène c-Kit. Plusieurs schémas posologiques de sunitinib ont été évalués dans des études cliniques. Sur la base des résultats de ces essais, le sunitinib est généralement initié à une dose de 50 mg par jour, administrée selon un schéma de trois semaines de traitement suivi de deux semaines de repos [53–55]. Cependant, des études de phase II ultérieures ont montré que la dose de 50 mg par jour suivie de deux semaines de repos était mieux tolérée, présentait moins d'effets indésirables et avait une efficacité similaire [56–58]. Notre équipe de recherche a récemment conduit une méta-analyse des toxicités des ITK anti-angiogéniques, contredisant cette donnée (manuscrit soumis).

Les avantages du sunitinib ont été démontrés initialement dans un essai de phase III portant sur 750 patients atteints de ccRCC métastatique ayant un pronostic favorable ou intermédiaire et n'ayant jamais reçu de traitement systémique auparavant [53–55]. Dans cet essai, les patients étaient randomisés pour recevoir du sunitinib ou de l'interféron alfa-2a. Par rapport à l'interféron alfa-2a, le sunitinib a montré les résultats suivants [36]: un taux de réponse objective significativement plus élevé (47 % contre 12 %), une survie sans progression significativement prolongée (médiane de survie sans progression de 11 mois contre 5 mois, HR 0,54) et une survie globale significativement prolongée (médiane de survie globale de 26,4 mois contre 21,8 mois, HR 0,82, IC à 95 % 0,67-1,00).

Tant pazopanib que sunitinib améliorent la SSP (par rapport respectivement au placebo ou à l'interféron alfa-2a). Les données prospectives indiquent que ces deux principes actifs ont des résultats de survie globale similaires, bien que le pazopanib soit moins toxique, y compris en ce qui concerne la fatigue. Le pazopanib et le sunitinib ont d'ailleurs été comparés dans deux essais randomisés. Le premier essai comprenait 1 110 patients assignés au hasard pour recevoir du pazopanib ou du sunitinib [59,60]. Par rapport au sunitinib, le pazopanib n'a montré aucune différence significative en termes de SSP (SSP médiane de 8,4 mois par rapport à 9,5 mois, HR 1,05, IC à 95 % 0,90-1,22), aucune différence significative en termes de survie globale (médiane de 28,3 mois par rapport à 29,1 mois, HR 0,92, IC à 95 % 0,79-1,06), un taux de réponse objective plus élevé (31% contre 25%), des taux d'arrêt du médicament en raison de la toxicité similaires (24% contre 20%), principalement en raison d'une perturbation des tests de la fonction hépatique (6% contre 1%), une amélioration de la qualité de vie liée à la santé, y compris une

amélioration des symptômes bucco-pharyngés, moins de fatigue et moins de douleurs musculaires.

Cabozantinib est un ITK anti VEGFR inhibant également les gènes *MET* et *AXL*, qui sont associés à un pronostic défavorable et au développement d'une résistance à l'inhibition du VEGF. Cabozantinib a été comparé à l'everolimus chez les patients déjà traités et au sunitinib chez les patients non traités. Les doses et les schémas posologiques de cabozantinib pour le RCC sont différents de ceux pour le cancer médullaire de la thyroïde [61].

Axitinib est un anti-VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3. Axitinib a montré un taux de réponse plus élevé que le sorafenib dans des essais cliniques randomisés. Cependant, axitinib n'a pas été directement comparé au pazopanib ou au sunitinib en tant que traitement initial, ni au cabozantinib. Dans un essai clinique randomisé de phase II, 213 patients non traités ont été traités avec axitinib (5 mg deux fois par jour) pendant quatre semaines, puis ont été randomisés pour recevoir soit une dose ajustée d'axitinib (progressant de 5 à 7 mg jusqu'à 10 mg deux fois par jour en fonction de la tolérance) soit axitinib à la dose standard placebo [62,63]. Le taux de réponse objective était plus élevé chez les patients recevant axitinib par rapport au placebo (54 % contre 34 %), mais la SSP était similaire (médiane de 14,5 mois contre 15,7 mois, HR 0,85, IC à 95 % 0,54-1,35), ce qui suggère que l'ajustement de la dose d'axitinib en fonction de la survenue de l'hypertension n'affectait pas les résultats chez la majorité des patients.

Lenvatinib est un inhibiteur de tyrosine kinase multi-cibles utilisé dans le cancer différencié de la thyroïde. Dans un essai de phase II, 153 patients atteints d'un RCC, métastatique ou non résécable, ont été randomisés pour recevoir lenvatinib (18 mg par jour) en association avec everolimus (5 mg par jour), lenvatinib (24 mg par jour) ou everolimus (10 mg par jour). Tous les patients avaient été précédemment traités et avaient un score ECOG de 0 ou 1. Le critère principal de survie sans progression (PFS) était significativement prolongé avec la combinaison par rapport à everolimus seul (PFS médiane de 14,6 mois contre 5,5 mois, HR 0,40, IC à 95 % 0,24-0,68). La survie globale a également augmenté avec la combinaison à everolimus, bien que la différence ne soit pas statistiquement significative au seuil de données principal (survie médiane de 25,5 mois contre 15,4 mois, HR 0,55, IC à 95 % 0,30-1,01). La survie globale médiane avec le traitement monothérapeutique lenvatinib était de 18,4 mois [64].

L'association de lenvatinib avec everolimus a été approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis en mai 2016 en tant que traitement pour les patients ayant

déjà reçu un traitement par un inhibiteur de la voie mTOR. Cette combinaison n'a pas été comparée dans des essais randomisés avec nivolumab, cabozantinib ou axitinib.

Tivozanib, un inhibiteur sélectif des récepteurs du VEGFR, est actif chez les patients ayant progressé après au moins deux traitements systémiques (y compris au moins un inhibiteur du VEGFR précédent). Tivozanib est une option disponible pour les patients ayant progressé sur des thérapies ciblées par immunothérapie et des inhibiteurs du VEGFR, en monothérapie ou en association. Dans un essai de phase III (TIVO-3), tivozanib a amélioré la survie sans progression (PFS) mais n'a pas amélioré la survie globale chez les patients atteints d'un RCC résistant aux traitements, y compris ceux ayant déjà été traités par des inhibiteurs du VEGF en monothérapie ou en association avec une immunothérapie [65,66].

La cible du mécanisme d'action de la rapamycine (mTOR) est liée à la voie de la phosphoinositide-30-kinase et de l'AKT régulée par le gène suppresseur de tumeur phosphatase et tensin homologue (*PTEN*). Bien que les inhibiteurs de mTOR soient efficaces dans le traitement du RCC, les résultats de traitement avec le temsirolimus et l'everolimus sont limités, sauf chez les patients ayant développé une résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) ou aux récepteurs du facteur de croissance endothérial vasculaire (VEGFR) ou chez les individus présentant des mutations dans la voie PI3K.

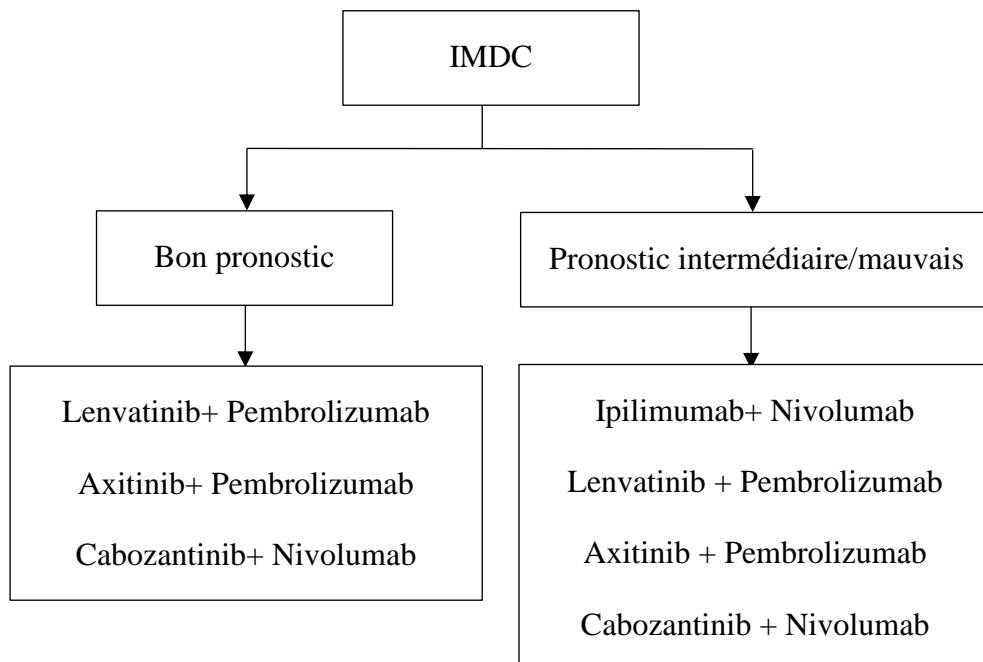
### **Immunothérapies**

Le traitement immunothérapeutique est une option cruciale dans la gestion des patients atteints de carcinome à cellules rénales avancé, que ce soit en tant que traitement initial ou en tant que traitement ultérieur après une thérapie ciblée.

Les immunothérapies, en inhibant les points de contrôle de la voie de signalisation du PD-1 (DP-1) et/ou en bloquant les antigènes liés aux lymphocytes T cytotoxiques 4 (CTLA-4), a montré une avancée significative dans le traitement de diverses tumeurs malignes, y compris le carcinome à cellules rénales avancé (Figure 1).

L'association de nivolumab (un anticorps anti-PD-1) et d'ipilimumab (un anticorps anti-CTLA-4) dans le traitement des patients atteints de carcinome à cellules rénales (RCC) à risque intermédiaire et faible a été étudiée à partir de 2018. Nivolumab en monothérapie a également montré des avantages en termes de survie globale (OS) chez les patients ayant progressé après un traitement anti-angiogénique initial [67,68].

C'est ensuite en première ligne métastatique que l'apport de ces nouvelles thérapies est majeur avec 4 études importantes ayant récemment modifié les pratiques cliniques en première ligne métastatique : Checkmate 214, Keynote 426, JAVELIN renal 101, et CheckMate 9ER. Les critères IMDC sont d'ailleurs prédictifs et facilitent la sélection thérapeutique en première intention (Figure 2).



*Figure 2. Traitement systémique de première intention du ccRCCs métastatiques[69]*

L'essai de phase III Checkmate 214 a comparé l'association de deux immunothérapies, ipilimumab (anti-CTLA4) et nivolumab (anti-PD1), avec un inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) anti-angiogénique, le sunitinib. L'association a montré un avantage significatif en termes de survie globale (OS) avec des taux de survie à 5 ans de 43 % pour la thérapie combinée et de 31% pour le sunitinib, chez les patients présentant un profil de risque intermédiaire ou mauvais selon l'IMDC [70]. Dans cette étude, le niveau d'expression de PD-L1 par les cellules tumorales a été étudié en immunohistochimie, et les tumeurs PD-L1 positives semblent bénéficier davantage de la thérapie combinée par ipilimumab + nivolumab (taux de risque (HR) de 0,46 pour la survie sans progression (PFS) (IC à 95 % : 0,31–0,67) ; HR de 0,45 pour la survie globale (OS) (IC à 95 % : 0,29–0,71)). Chez les patients dont la tumeur est PD-L1 négative, un avantage est observé en termes de survie globale avec une réduction plus faible du risque (HR de 0,73 (IC à 95 % : 0,56–0,96)), mais pas pour la survie sans progression (PFS) [71].

L'essai de phase III Keynote 426 a comparé l'association pembrolizumab (anti-PD1) et axitinib (ITK anti-angiogénique) avec du sunitinib. Les critères d'évaluation principaux de l'étude étaient la survie globale (OS) et la survie sans progression (PFS) dans la cohorte globale. Pour le pembrolizumab + axitinib, on a observé une amélioration significative de la PFS (HR 0,68) et de l'OS (HR 0,73) après un suivi médian de 43 mois. Le taux de réponse objective (ORR) était de 60% (contre 40 % pour le sunitinib) ; le taux de réponse complète (CR) était de 10 % (contre 3,5%). À noter que le taux de contrôle de la maladie était élevé à 83% (contre 75%); seulement 11,3% des patients étaient en progression d'emblée contre 17,0% (résistance primaire). Les analyses en sous-groupes ont révélé que l'avantage du pembrolizumab + axitinib en termes de survie est limité aux patients présentant un risque IMDC intermédiaire et mauvais, tandis que les patients présentant un risque favorable ne semblent pas bénéficier par rapport au sunitinib seule. Aucune plateau dans la courbe de PFS semble indiquer des rémissions à très long terme comme cela a été rapporté pour le nivolumab + ipilimumab, même avec un suivi prolongé [51] ].

L'étude JAVELIN renal 101 a comparé le sunitinib en monothérapie à l'association avelumab (anti-PD-L1) et axitinib. Les critères d'évaluation de l'étude JAVELIN renal 101 étaient le temps de survie sans progression (PFS) et la survie globale (OS) dans les tumeurs PD-L1 positives. Après 19 mois de suivi médian, l'étude a montré une amélioration significative de la PFS dans le groupe PD-L1 positif (HR 0,62) ainsi que pour l'ensemble de la population (HR 0,69). Pour l'OS, les données sont encore incomplètes. Jusqu'à présent, avec un HR de 0,80 pour l'ensemble de la population, aucun bénéfice significatif n'a été démontré pour la combinaison avelumab + axitinib. Le taux de réponse objective (ORR) était de 56% pour les tumeurs PD-L1 positives (contre 27% pour le sunitinib) avec un taux de réponse complète (CR) de 5,6% (contre 2,4%). Le taux de contrôle de la maladie était de 83 % pour la combinaison contre 69% pour le sunitinib [73].

Enfin, l'essai clinique phase 3 CheckMate 9ER a évalué le nivolumab en association avec le cabozantinib (TKI anti-angiogénique) versus sunitinib en monothérapie. Tous les groupes à risque IMDC semblent en bénéficié, avec l'effet le plus important chez les patients de mauvais pronostic (HR 0,36) et le plus faible effet chez les patients de bon pronostic (HR 0,58) [74].

D'autres résultats prometteurs ont été récemment rapportés pour l'étude CLEAR, qui compare 3 groupes de traitement : (i) pembrolizumab (200 mg toutes les trois semaines, i.v.) + lenvatinib (20 mg/jour, par voie orale, qui est un ITK anti-angiogénique), (ii) lenvatinib (18 mg/jour, par

voie orale) + évérolimus (5 mg/jour, par voie orale, qui est un inhibiteur de mTOR) et (iii) sunitinib (schéma standard de 50 mg/jour 4 semaines sur 6). Le critère d'évaluation principal était la SSP. Après un suivi médian de 27 mois, la SSP médiane était de 24 mois pour pembrolizumab + lenvatinib contre 9,2 mois pour sunitinib (HR 0,39, Tableau 1). Les patients ont bénéficié de l'association pembrolizumab + lenvatinib quel que soit leur profil de risque IMDC et leur statut PD-L1. La SG médiane n'a été atteinte dans aucun des groupes de l'étude à ce jour, mais le pembrolizumab + lenvatinib (contrairement à lenvatinib + évérolimus) a montré des avantages par rapport au sunitinib (HR 0,66). L'ORR pour pembrolizumab + lenvatinib était remarquable avec 71% (vs 36% pour le sunitinib). Cependant, lorsque l'on compare (indirectement) les données d'efficacité de pembrolizumab + lenvatinib à celles d'autres essais (par exemple, CheckMate 9ER), il convient de considérer que CLEAR incluait globalement des patients présentant un profil de faible risque [75].

En 2<sup>ème</sup> ligne après immunothérapie, la recommandation est celle d'un traitement par ITK anti-angiogénique [76]. La question du type d'ITK se pose, avec sans doute des profils d'efficacité assez similaires, mais par contre des profils de toxicités différents. Notre unité de recherche vient de réaliser une méta-analyse des toxicités des 7 ITK approuvés, quel que soit le type de cancer, avec un profil plus favorable pour le pazopanib (*en cours de soumission*), rejoignant en cela l'étude préférence patient ayant comparé sunitinib et pazopanib en première ligne métastatique dans le cancer du rein [77].

En résumé, le traitement du cancer du rein à cellules claires repose sur une approche multidisciplinaire, avec des options de traitement ciblant avant tout l'angiogénèse et la restauration d'une immunité efficace. Il n'y a finalement pas de vrai traitement ciblé guidé par une altération génétique. En outre les résistances secondaires sont quasi systématiques, justifiant l'identification de nouveaux biomarqueurs pertinents, cibles thérapeutiques potentielles.

## **2. Génomique du cancer du rein et méthodes d'analyses fonctionnelles du génome**

Au cours des 15 dernières années, les traitements anti-angiogéniques, et plus récemment les immunothérapies, ont considérablement amélioré le pronostic du carcinome à cellules rénales métastatique. Cependant, la résistance acquise se produit presque constamment [78], remettant en question la pratique quotidienne en oncologie.

La réponse différentielle aux médicaments est étroitement liée au génotype de la tumeur. Au cours des dernières décennies, la recherche sur la génétique du cancer humain a considérablement bénéficié des nouvelles technologies, notamment le séquençage complet du génome, pour mieux comprendre la carcinogenèse, ainsi qu'à des fins diagnostiques et thérapeutiques. Cela est particulièrement vrai pour le carcinome à cellules rénales. De plus, plusieurs approches d'échantillonnage multiple ont contribué à déchiffrer l'hétérogénéité des RCC primaires [79].

Les biopsies guidées par radiologie des métastases ont contribué au séquençage des échantillons métastatiques et ont ainsi aidé à explorer la biologie de la maladie métastatique, y compris l'expansion clonale de clones minoritaires issus d'une tumeur primaire.

Actuellement, de nombreuses technologies différentes sont utilisées pour étudier l'épigénomique, la génomique et la transcriptomique. L'épigénomique se concentre sur l'identification des modifications impliquées dans les mécanismes de régulation qui contrôlent l'expression des gènes, telles que la méthylation de l'ADN, les modifications des histones, la liaison aux facteurs de transcription, l'accessibilité de la chromatine ou la conformation tridimensionnelle de la chromatine. Les analyses génomiques permettent l'étude des modifications de l'ADN, comme les mutations génétiques, les variations du nombre de copies, les pertes d'hétérozygotie et les réarrangements chromosomiques. En ce qui concerne la transcriptomique, elle permet de mesurer le niveau d'expression des ARNm présents dans la cellule, ce qui reflète directement les gènes exprimés à un moment donné. Les technologies couramment utilisées pour effectuer ces analyses sont décrites en détail dans le Tableau 1 [80].

*Tableau 2. Résumé des principaux avantages et inconvénients des technologies les plus couramment utilisées pour l'analyse fonctionnelle du génome et de l'épigénome*

Technique	Mécanisme/But	Avantages	Inconvénients
<b>Méthodes de détection des variants génomiques</b>			
FISH	Détection des séquences d'ADN basé sur des sondes s'hybridant à une cible spécifique	Haute sensibilité et spécificité	Il n'est possible de visualiser que la région du génome complémentaire de

			la sonde utilisée.
aCGH			Inapproprié pour la détection de réarrangements chromosomiques équilibrés
Sanger	<p>Peut être utilisé comme méthode complémentaire pour confirmer des variants identifiés par le NGS</p> <p>Séquençage ciblé, à bas débit, qu'un seul fragment d'ADN à la fois (800-1000 bp)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Haute qualité et reproductibilité</li> <li>- Ne nécessite pas de connaissance a priori sur les caractéristiques génomiques</li> <li>- Demande une faible quantité d'ADN/ARN en entrée</li> </ul>	Prend beaucoup de temps et peu rentable pour des fragments d'ADN de grande taille
NGS	Séquençage du génome entier	Ne se limite pas à un seul fragment d'ADN, mais analyse des millions de fragments grâce à une technologie de séquençage massivement parallèle	Matériel coûteux Lourdeur des analyses bio-informatiques
Targeted NGS (NGS ciblé)	Séquençage des régions d'intérêt	<p>Diminution du coût</p> <p>Analyse simplifiée</p> <p>Sensibilité élevée</p> <p>Nécessite une faible quantité d'ADN (10ng)</p>	Pouvoir manquer des variantes pertinentes si elles ne sont pas dans le panel de gène

WES	Séquençage uniquement des exons (régions codant pour les protéines)	- Flux de travail plus rapide que WGS - Nécessite une faible quantité d'ADN (50ng–1µg) - Sensibilité, mais plus faible que targetd NGS	Analyse des données compliquée dans le cas de variants non spécifiés
RT-PCR	Évaluation quantitative absolue de l'expression génétique	- Simple, rapide, précise, sensible	Ne pouvoir détecter que des séquences connues.
PCR classique	Le séquençage Le génotypage Le clonage	Simple, rapide	Faible précision Faible sensibilité Faible résolution Les résultats ne sont pas exprimés en chiffres
dd- PCR	Detection les variations structurelles, les variations du nombre de copies et les SNP, de manière rapide et rentable à partir des tissus tumoraux FFPE.	Sensibilité, beaucoup élevée, précise	Plus couteux que la RT-PCR
OncoScan™	Detection les variations structurelles, les variations du nombre de copies et les SNP, de manière rapide et rentable à partir des tissus tumoraux FFPE.	Générer des cibles d'hybridation de puce multiplexée à partir de séquences aussi courtes que 40 paires de bases et à partir d'environ 80 ng d'ADN génomique.	Coûteux
<b>Epigénomique</b>			

Methyl-seq (WGBS/RRBS)	Méthylation de l'ADN	Haute résolution CpG	Lourdeur des analyses bio-informatiques Coûteux
MRE-seq	Méthylation de l'ADN	Facile à utiliser	Limiter par l'utilisation d'une enzyme spécifique et par son activité
ChIP-seq	Modifications des histones	Technique bien rodée	Besoin d'un nombre élevé de cellules  Reproductibilité incertaine
ATAC-seq	Modifications des histones	Simple  Ne nécessite qu'un faible nombre de cellules	Peut avoir des biais de séquence

### Transcriptome

SAGE	Analyser tous les transcrits (y compris de nouveaux gènes) sans connaissance préalable des gènes	Directe, quantitative  Analyse de données simple  Sensibilité pour détecter des transcrits peu exprimé	Faible débit  Coût et prend du temps par rapport microarrays
qPCR		- Rapide,  précise, sensible et hautement reproductible pour la quantification de l'ARNm.  - Capacité à détecter la quantité de mRNRA en	- Risque de biais

		temps réel	
cDNA Microarrays	Mesurer le niveau d'expression des gènes	Méthode à fort débit et quantitative  Rapide, sensible, spécifique	Lourdeur des analyses bio-informatiques
RNA-seq	L'identification de gènes, de transcrits ou d'expression spécifique d'allèle  Faciliter la découverte de mutations rares, d'isoformes de gènes auparavant non reconnus	Rapide, précise, sensible et à haut débit  Peut être réalisée sur des tissus fixés en formol  Ne nécessite pas de connaissance a priori sur les caractéristiques génomiques.	Coûteux  Lourdeur des analyses bio-informatiques

*WGBS: Whole-genome bisulfite sequencing; MRE-seq: Methylation Restriction Enzyme sequencing; ChIP-seq: Chromatin immunoprecipitation sequencing; ATAC-seq: Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing; FISH: Fluorescence in situ hybridization aCGH: Array comparative genomic hybridization; Targeted NGS: Targeted next generation sequencing; WES: Whole exome sequencing; WGS: Whole genome sequencing RT-PCR: Real-time polymerase chain reaction; dd-PCR: digital droplet polymerase chain reaction ;SAGE: Serial analysis of gene expression*

Dans ce paragraphe, je propose de détailler les techniques de biologie moléculaire que j'ai utilisées pendant ma Thèse de Sciences.

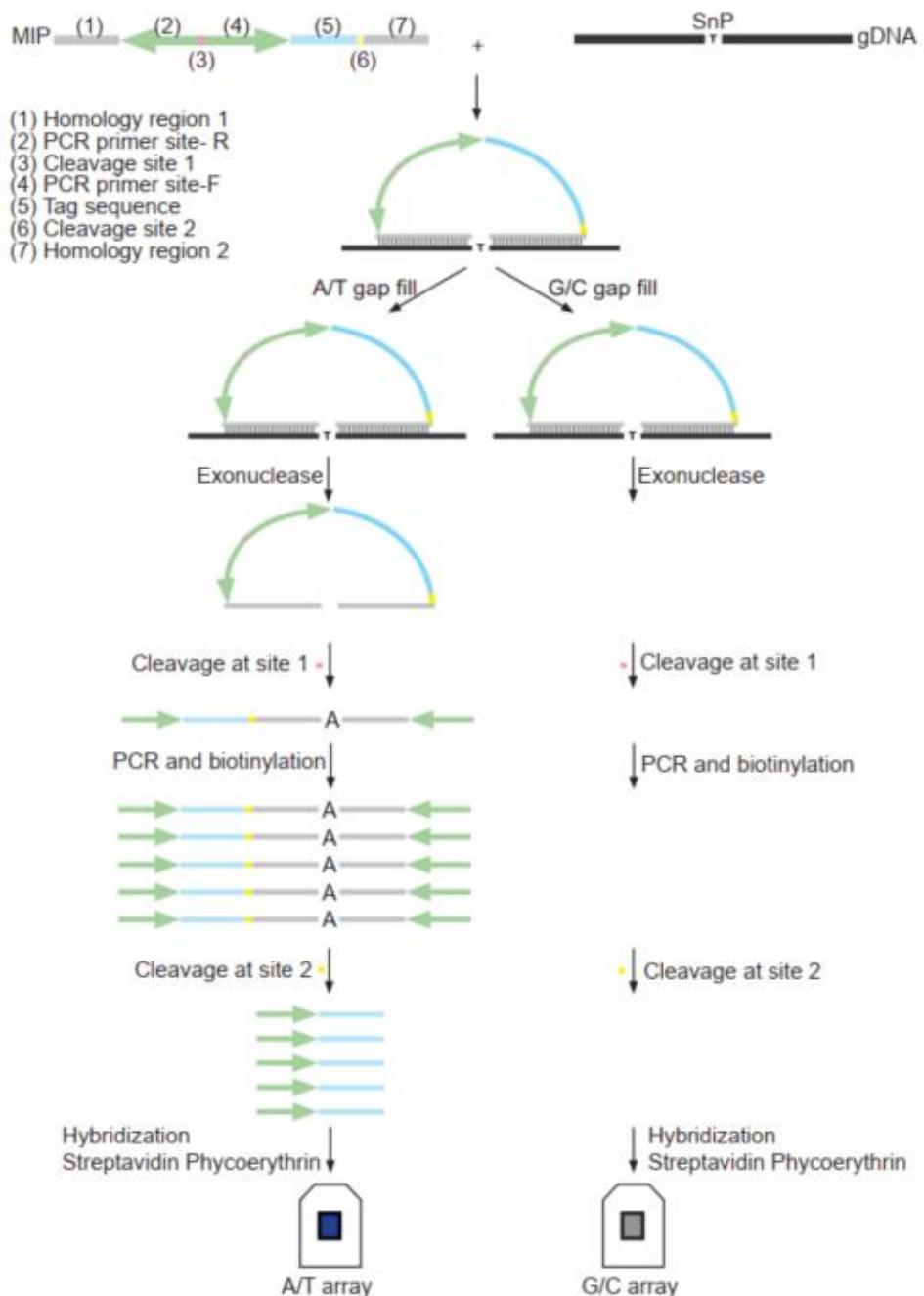
### 1.1. La technologie OncoScan™ (Affymetrix®)

Les analyses du génome complet sont généralement effectuées sur des échantillons fixés au formol, qui constituent une ressource considérable à l'échelle mondiale, avec plus d'un milliard d'échantillons disponibles [81]. Cependant, la fixation au formol est associée à des modifications conformationnelles de l'ADN en raison de la formation de ponts disulfure, de liaisons croisées ADN-protéine et de la fragmentation de l'ADN en fragments de moins de 100 pb, limitant ainsi la détection de certaines mutations en fonction de la technologie utilisée [82].

En 2003, le kit de test Oncoscan™ FFPE a été développé pour détecter les variations du nombre de copies, les pertes d'hétérozygotie (LOH) et certaines mutations somatiques « hot-spot » liées

au cancer, en utilisant de l'ADN extrait de tissus fixés. Ce test utilise des sondes avec une empreinte génomique de 40 pb [83–87]. Comparé au séquençage de nouvelle génération (NGS), le test OncoScan™ présentait une sensibilité et une spécificité supérieures, de 98%, même en utilisant des échantillons de mauvaise qualité fixés au formol et avec une fréquence plus faible de certains variants alléliques (5-10 %) [85]. La technologie OncoScan™ repose sur le principe suivant (Figure 3) : elle emploie des sondes comportant une région de 20 paires de bases de chaque côté, complémentaire à l'ADN génomique d'intérêt, ainsi qu'une région centrale comprenant un marqueur unique pour chaque sonde et deux sites de primers universels présents dans toutes les sondes, accompagnés de deux sites de coupure. L'assay OncoScan™ utilise 335 000 sondes pour les variations du nombre de copies (CNVs) et les fréquences alléliques, ainsi que 541 sondes pour les mutations somatiques du cancer [88].

OncoScan-Express™ utilise un système de génotypage basé sur l'utilisation de sonde inversées (« molecular inverted primers » MIP) dédiées aux tissus fixés en formol/dérivés formolés et dont l'ADN est supposément fragmenté avec des fragments d'environ 100-200 paires de base. Cette technique permet le génotypage de 330000 SNP, détermine les altérations de nombre de copies, les pertes d'hétérozygotie (LOH), et enfin les mutations somatiques dans des hot-spots mutationnels prédefinis par la technologie. Les sondes MIP sont des oligonucléotides circularisables, dont les deux extrémités portent deux séquences complémentaires à deux séquences sur le génome, séparées par un seul nucléotide (où se trouve le variant à caractériser). Après hybridation de l'ADN génomique, le produit de la réaction est divisé entre deux tubes, et deux nucléotides sont ajoutés à chaque tube (A/T et C/G). Dans le tube comprenant le nucléotide complémentaire à l'allèle sur le génome, la sonde MIP devient circulaire. Cette structure circulaire est alors sélectionnée, puis de nouveau linéarisée à l'aide d'exonucléases. Les séquences qui ont été sélectionnées sont amplifiées et hybridées sur une puce Affymetrix pour leur identification. Au moment où nous avons effectué l'analyse, OncoScan™ Assay offrait la possibilité d'identifier 541 mutations somatiques hot-spots, avec une couverture de plus de 200 gènes suppresseurs de tumeurs et oncogènes. La technologie permet de couvrir le génome avec un espacement médian de 1 sonde par 0,5 kb pour les 10 principaux gènes suppresseurs de tumeurs « actionnables », un espacement médian de 1 sonde par 2 kb pour les plus de 190 oncogènes actionnables, et un espacement médian de 1 sonde par 9 kB pour le reste du génome.



MIP: molecular inversion probe; SnP: Single nucleotide polymorphism; gDNA: genomic DNA

Figure 3. Principe de la technologie d'OncoScan™ (adapté d'Affymetrix®)

**Technologie OncoscanTM et la Sonde d'Inversion Moléculaire : Procédures de Génération de Cibles et d'Hybridation.** a) Appariement : Hybridation des sondes avec l'ADN génomique ; b) Remplissage des lacunes avec des nucléotides A/T ou G/C ; c) Sélection de l'exonucléase pour les sondes remplies ; d) Clivage au site 1 pour l'ouverture et l'inversion de la sonde ; e) Amplification et biotinylation de la sonde ; f) Clivage au site 2 pour libérer la séquence d'étiquetage ; g) Hybridation sur puce suivie d'une coloration à la phycoérythrine par interaction biotine-streptavidine ; h) Balayage de la puce. Les couleurs bleue et grise indiquent respectivement la présence et l'absence du signal de fluorescence à la phycoérythrine

## 1.2. La PCR (Polymerase Chain Reaction)

La réaction de polymérase en chaîne (PCR) est une technique d'amplification d'un fragment d'ADN spécifique à partir d'un pool complexe d'ADN. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie.

Il en existe trois types :

- ***La PCR classique*** : Les mesures sont effectuées pendant la phase de plateau, ce qui peut entraîner des résultats variables. C'est une limitation de la PCR classique.
- ***La PCR en temps réel*** (RT-PCR : real-time PCR) se concentre sur la phase exponentielle, car elle fournit des données quantitatives plus précises et reproductibles. Pendant cette phase, l'instrument de PCR en temps réel identifie le cycle auquel la réaction dépasse l'intensité de fluorescence du bruit de fond, appelé Cycle de Quantification (Cq). En comparant les valeurs de Cq des échantillons de concentration inconnue à une série d'échantillons étalonnés, la quantité d'ADN dans un échantillon inconnu peut être précisément déterminée.
- ***La PCR digitale en gouttelettes*** (ddPCR : Digital Droplet PCR) est une méthode ultrasensible et absolue de quantification des acides nucléiques. Elle fonctionne en divisant un échantillon en environ 20 000 petites gouttelettes, puis une amplification PCR est réalisée dans chacune de ces gouttelettes. Après la PCR, chaque gouttelette est analysée pour déterminer la proportion de gouttelettes positives dans l'échantillon initial.

En matière de discrimination allélique pour une mutation "hotspot" dans un gène bien identifié, la ddPCR offre la possibilité d'identifier et de quantifier cette mutation connue (le plus souvent un hotspot) avec une sensibilité extrêmement élevée en utilisant une sonde spécifique pour la mutation ainsi que pour la séquence non mutée. En effet, la limite de détection de cette méthode est d'environ 0,1 %. Cependant, elle ne permet pas de repérer d'autres mutations que celles qui sont recherchées

Plusieurs questions sont en suspens, auxquelles j'ai tenté de répondre durant ma Thèse de Sciences :

- 1) Pour les carcinomes à cellule rénales de type ccRCC, y a-t-il une signature propre aux localisations métastatiques par rapport aux tumeurs primitives?
- 2) Peut-on identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour les ccRCCs métastatiques?

## II. DOMAINE DE RECHERCHE

### 1. Pour les carcinomes à cellule rénales de type ccRCC, y a-t-il une signature propre aux localisations métastatiques par rapport aux tumeurs primitives?

Dans le cadre de ma Thèse, nous avons proposé une approche méta-analytique originale puisque l'on a réalisé la première méta-analyse de données génomiques de cancers, appliquée ici au ccRCC, à partir à la fois de tumeurs primitives et de métastases afin d'évaluer au mieux la prévalence des mutations géniques et des altérations du nombre de copies.

Ce travail de recherche a fait l'objet d'une publication dont je suis première auteur, dans la revue *European Urology* (IF: 23,4 (rank Q1 2/124 Urology & Nephrology)) [89]. Notre méta-analyse a porté sur 14 696 patients avec un total de 15 268 échantillons, dont 14 299 échantillons de tumeurs primitives, 969 échantillons de métastases.

#### *1.1. Matériel et méthodes*

##### **Stratégie de recherche et critères de sélection**

Nous avons effectué cette revue systématique en suivant les méthodes décrites par le Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses (PRISMA)[90].

##### **Critères d'éligibilité**

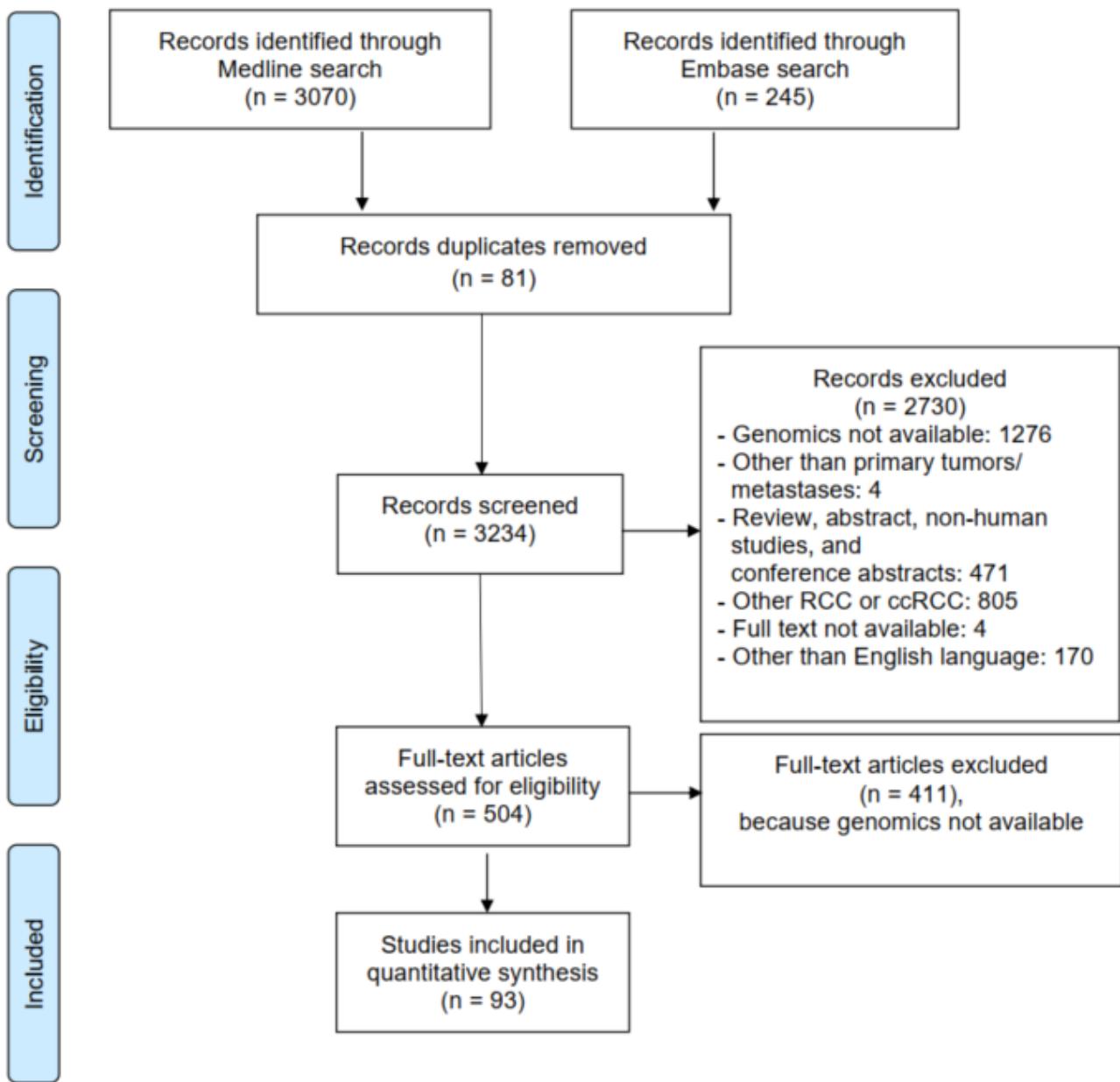
##### Critères d'inclusion

Notre objectif était d'effectuer une méta-analyse sur les données génomiques obtenues à partir de ccRCC, y compris les tumeurs primitives et les métastases, afin d'évaluer la prévalence des mutations géniques et des altérations du nombre de copies. Les critères d'inclusion étaient les

suivants : (1) toute étude originale évaluant la génomique des ccRCC primitifs et/ou des métastases, et (2) tout article en anglais de 1999 à aujourd'hui.

#### Critères d'exclusion

Les critères d'exclusion suivants ont été appliqués : (1) les études avec des données génomiques inutilisables ou non disponibles ; (2) les données génomiques obtenues à partir d'échantillons autres que des échantillons de tissu (c'est-à-dire, l'ADN circulant) ; (3) les revues, les données expérimentales et les études non humaines, les lettres et les résumés de conférence ; (4) les études ne portant que sur des histologies autres que les ccRCC; (5) les articles sans texte intégral disponible ; (6) les articles dans une langue autre que l'anglais. Le modèle du diagramme PRISMA utilisé dans cette étude est détaillé dans la Figure 2.



*Figure 4. PRISMA flowchart for the screening and selection of the studies.*

### Stratégie de recherche

Les articles ont été sélectionnés à l'aide des bibliothèques Medline et Embase, et l'algorithme était le suivant : (“Kidney Neoplasms”[Mesh] OR “Renal Cell Carcinoma”) AND (“Genomics”[Mesh] OR “Mutation”), de janvier 1999 jusqu'à février 2021. Nous avons effectué une recherche manuelle dans les listes de références de tous les articles inclus pour identifier d'éventuels articles connexes. Le logiciel Zotero a été utilisé pour gérer les références et éliminer

tout article en double. De plus, les références contenues dans les articles recherchés et les articles pertinents ont également été pris en compte pour éviter de manquer des articles éligibles.

### **Sélection des études**

Deux auteurs (BTO et GB) ont indépendamment passé au crible les articles récupérés, d'abord par titre, puis par résumé et enfin par texte intégral.

### **Protocole et enregistrement**

Nous avons enregistré la revue dans PROSPERO, un registre prospectif international de revues systématiques. Le protocole peut être consulté à l'adresse suivante :

<https://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/> Numéro d'enregistrement : CRD42021245173

### **Évaluation de la qualité**

Deux auteurs (BTO et GB) ont évalué indépendamment la qualité de chaque étude, nous avons utilisé l'outil Q-genie [91]. Il comprend 11 questions portant sur les aspects suivants de la méthodologie de l'étude : justification de l'étude, sélection et résultats, comparabilité des groupes témoins, exposition technique et non technique, biais, taille et puissance de l'échantillon, analyses, méthodes statistiques, contrôle des facteurs de confusion, inférences pour les analyses génétiques et inférences à partir des résultats. Chaque question a été notée de 1 à 7 comme suit : « 1 (mauvais) », « 2 », « 3 (bon) », « 4 », « 5 (très bon) », « 6 » ou « 7 (excellent) ». Pour les études avec un groupe témoin, un score total de  $\leq 35$  indique une mauvaise qualité, un score de 36 à 45 indique une qualité modérée et un score de  $> 45$  indique une bonne qualité. Dans les études sans groupe témoin, un score total de  $\leq 32$  indique une qualité médiocre, un score entre 33 et 40 indique une qualité modérée, et un score supérieur à 40 indique une bonne qualité.

### **Analyse statistique**

La prévalence des mutations géniques (prévalence ponctuelle et groupée) a été illustrée par des graphiques en forêt, avec des intervalles de confiance à 95 %, en utilisant R Studio version 1.3 avec le package Meta. L'hétérogénéité a été évaluée à l'aide des statistiques Q basées sur le chi carré et des statistiques  $I^2$ , où  $I^2 = 0\%$  indiquait aucune hétérogénéité observée, 25 % était considéré comme faible, 50 % était modéré, et 75 % était élevé. Des analyses de sensibilité ont été réalisées en utilisant les paramètres suivants : méthode d'analyse génique (NGS ciblée ou séquençage Sanger en référence au NGS whole exome), conditions de préservation des tumeurs

(congelées vs. fixées en formol ou dérivé formolé), nombre d'échantillons (unique vs. multiples). Les différences de prévalence des mutations ou des variations du nombre de copies ont été rapportées sous forme d'odd-ratio (OR), en fonction de la méthode d'analyse génique, de la condition de préservation de l'échantillon biopsique et du nombre d'échantillons étudiés.

La signification statistique dans nos analyses a été fixée à P<0,05.

## **1.2. Résultats**

### **Sélection des études, caractéristiques et évaluation de la qualité**

Après la recherche bibliographique et la suppression des doublons, 3234 publications ont été identifiées. Après une sélection sur les titres et les résumés, 2730 publications ont été exclues, et les 504 articles restants ont été lus dans leur intégralité. 411 articles ont alors été exclus, car les données génomiques n'étaient pas disponibles. Au total, 93 articles ont finalement été inclus dans cette méta-analyse (Figure 4).

Les caractéristiques des 93 études sélectionnées sont résumées dans le Tableau 3. Dans l'ensemble, notre méta-analyse a inclus un total de 14696 patients avec un âge médian de 61 ans et un ratio homme/femme de 1,96, avec 14299 échantillons de tumeurs primitives et 969 échantillons de métastases. 79 études portaient sur des analyses génomiques à partir d'un seul échantillon, tandis que 14 études portaient sur des analyses génomiques à partir de plusieurs échantillons d'une même tumeur (primitive ou métastase).

Tableau 3. Principales caractéristiques des 93 études incluses dans la méta-analyse

ID	Auteur	Patient		Tumeur primitive		Métastase		Échantillon		Âge Médian (Min max)	Mâle/ Femelle	TMB	Méthodologie
		N	Oui Non	N	Oui Non	N	Plusieurs	N					
1	Hakimi et al [92], 2020	189	Oui	189	Non	-	Non	189	61 (35-89)	142/47	3,9 (0-22,6)	NGS (WES)	
2	Braun et al [93], 2020	454	Oui	454	Non	-	Non	454	61 (23-88)	321/133		NGS (WES)	
3	Ferronika et al [94], 2020	7	Oui	31	Non	-	Oui	31	57 (46-69)	4/3		NGS aCGH	
4	Correa et al [95], 2020	103	Oui	103	Non	-	Non	103	59 (28-84)	70/33		SNP	
5	Wang et al [96], 2020	152	Oui	152	Non	-	Non	152	55,5 (25-87)	111/41		NGS (WES)	
6	Hu et al [97], 2019	330	Oui	330	Non	-	Non	330	60 (26-90)	214/116		NGS (WES)	
7	Clark et coll. [98], 2019	103	Oui	103	Non	-	Non	103	61 (33-90)	77/26		NGS (WES)	
8	Nassar et coll. [99], 2019	109	Oui	109	Non	-	Non	109	58 (35-80)	79/30		NGS	
9	Nejati et al [100], 2019	103	Oui	103	Non	-	Non	103	-	67/33		SNP	
10	Palmbo et al [101], 2019	174	Oui	174	Non	-	Non	174	63,5 (54-71)	102/72		Cytogénétique	
11	Zhang et al [102], 2019	87	Oui	87	Non	-	Non	87	58 (22-83)	52/25	3,6 (0-22,9)	NGS	
12	Chen et al [103], 2019	1	Oui	2	Non	-	Oui	2	-	-		NGS ciblé	
13	Grimm et al [104], 2019	100	Oui	50	Oui	50	Non	100	66 (38-90)	69/31		FISH	

		100	Oui	68	Oui	32	Non	100	66 (32-90)	58/39	
14	Huang et al [105], 2019	473	Oui	473	Non	-	Non	473	-	-	NGS (WES, WGS)
15	Stenehjem et al [106], 2019	79	Oui	79	Non	-	Non	79	61 (55-70)	56/23	aCGH NGS
16	Bihr et al [107], 2019	83	Oui	83	Non	-	Non	83	-	-	NGS
17	Li et al [108], 2019	417	Oui	417	Non	-	Non	417	-	-	NGS (WES)
18	Saeed et al [109], 2019	3	Oui	3	Oui	1	Non	4	68 (61-75)	3/0	NGS (WES)
19	Voss et al [110], 2018	1110	Oui	357	Non	-	Non	357	-	-	NGS
20	Warsow et al [111], 2018	5	Oui	16	Non	-	Oui	16	59 (47-83)	3/2	NGS
21	de Velasco et al [112], 2018	586	Oui	349	Oui	229	Non	578	58 (11-85)	417/169	NGS ciblé
		257	Oui	177	Oui	80	Non	257	64 (38-89)	88/169	
22	Turajlic et al [113], 2018	100	Oui	575	Oui	335	Oui	910	65 (47-84)	25/13	NGS (ES, WGS)
23	Turajlic et al [114], 2018	101	Oui	106	Non	-	Oui	106	64 (34-84)	68/33	NGS (ES, WGS)
24	Mitchel et al [115], 2018	33	Oui	34	Non	-	Oui	34	62 (45-82)	-	NGS (WGS)
25	Nouhaud et al [116], 2018	47	Oui	47	Non	-	Non	47	60,5 (36-79)	31/19	CNV array
26	Manley et al [117], 2017	203	Oui	203	Non	-	Non	203	60 (52-71)	132/71	NGS ( WES )
27	Becerra et al [118], 2018	60	Oui	60	Oui	60	Non	120	55 (22-71)	41/19	NGS

28	Casuscelli et al [119], 2019	147	Oui	147	Non	-	Non	147	58 (31-81)	101/46	NGS
29	Wei et al [120], 2017	dix	Oui	64	Non	-	Oui	64	-	-	NGS ( WGS , WES )
30	Mikhailenko et al [121], 2017	307	Oui	307	Non	-	Non	307	-	-	Séquençage de Sanger
31	Dagher et al [122], 2017	4	Oui	4	Oui	4	Non	8	57,5 (54-70)	4/0	NGS, aCGH
32	Li et al [123], 2017	499	Oui	499	-	-	Non	499	-	-	SNP, NGS (WGS)
33	Wang et al [124], 2016	548	Oui	548	-	-	Non	548	-	-	NGS
34	Kouba et al [125], 2016	20	Oui	20	Oui	20	Non	40	60 (46-82)	11/9	FISH
35	Razafinjatovo et al [126], 2016	360	Oui	360	Non	-	Non	360	64	-	Séquençage de Sanger
36	Manley et al [127], 2017	1049	Oui	1049	Non	-	Non	1049	61 (21-91)	716/333	NGS
37	Lim et al [128], 2016	15	Oui	15	Non	-	Non	15	56 (45-76)	11/4	NGS ciblé
38	Togo et al [129], 2016	45	Oui	45	Non	-	Non	45	64,5 (44-84)	30/15	Cibler le NGS Microsatellite
39	Kohn et al [130], 2015	74	Oui	74	Non	-	Non	74	67 (44-87)	43/31	Tableau SNP Cibler le NGS
40	Kang et al [131], 2015	46	Oui	46	Non	-	Non	46	-	-	aCGH
41	Kanu et al [132], 2015	324	Oui	324	Non	-	Non	324	-	-	Analyse MSI NGS

42	Beuselinck et al [133], 2015	117	Oui	117	Non	-	Non	117	60 (38-80)	87/34	Séquençage de Sanger
43	Scelo et al [134], 2014	94	Oui	94	Non	-	Non	94	60 (38-83)	52/42	NGS (WGS)
44	Alves et al [135], 2014	91	Oui	91	Non	-	Non	91	56	89/59	Séquençage de Sanger
45	Gerlinger et al [136], 2014	dix	Oui	79	Oui	-	Oui	79	63 (47-79)	7/3	NGS (WES)
46	Muscarella et al [137], 2013	35	Oui	35	Non	-	Non	35	67 (58-75)	18/17	Séquençage de Sanger
47	Sato et al [38], 2013	106	Oui	106	Non	-	Non	106	64,5 (21-91)	78/28	NGS (ES, WGS)
48	TCGA [138], 2013	417	Oui	417	Non	-	Non	417	61 (26-90)	290/156	NGS (ES, WGS)
49	Peña-Llopis et al [40], 2012	76	Oui	176	Non	-	Non	176	63 (26-84)	44/32	Séquençage de Sanger NGS (ES)
50	Gerlinger et al [139], 2012	2	Oui	13	Oui	4	Oui	17	67 (59-75)	2/0	NGS (WES)
51	Guo et al [140], 2011	98	Oui	98	Non	-	Non	98	57 (28-80)	59/39	Séquençage de Sanger
52	Dondeti et al [141], 2012	54	Oui	54	Non	-	Non	54	60 (31-86)	33/14	SNP
53	Moore et al [142], 2011	507	Oui	507	Non	-	Non	507	-	309/198	Séquençage de Sanger
54	Monzon et al [143], 2011	112	Oui	112	Non	-	Non	112	-	-	SNP

55	Rechsteiner et al [144], 2011	256	Oui	256	Non	-	Non	256	-	-	Séquençage de Sanger
56	Varela et al [145], 2011	257	Oui	257	Non	-	Non	257	-	-	Séquençage de Sanger
57	La Rochelle et al [146], 2010	70 3	Oui	70 3	Non	-	Non	70 3	-	-	FISH
58	Kuroda et al [147], 2010	16	Oui	16	Non	-	Non	16	63,5 (50-79)	12/4	Cytogénétique
59	Chen et al [148], 2009	80	Oui	80	Non	-	Non	80	60	43/27	SNP-CGH
60	Cheng et al [149], 2008	26	Oui	62	Non	-	Oui	62	58,5 (21-84)	16/10	FISH
61	Arai et al [150], 2008	51	Oui	51	Non	-	Non	51	59 (31-81)	34/17	aCGH FISH
62	Nickerson et al [151], 2008	205	Oui	205	Non	-	Non	205	-	122/83	Séquençage de Sanger
63	Smits et al [152], 2008	185	Oui	185	Non	-	Non	185	68	110/75	Séquençage de Sanger
64	Cifola et al [153], 2008	27	Oui	27	Non	-	Non	27	-	-	SNP
65	Yoshimoto et al [154], 2007	26	Oui	26	Non	-	Non	26	62 (46-85)	21/5	
66	Gime'nez-Bachs et al [155], 2007	96	Oui	96	Non	-	Non	96	64	64/32	Séquençage de Sanger
67	Brunelli et al [156], 2008	73	Oui	73	Non	-	Non	73	65 (54-71)	55/18	FISH
68	Hirata et al [157], 2005	126	Oui	126	Non	-	Non	126	63	84/42	Microsatellite

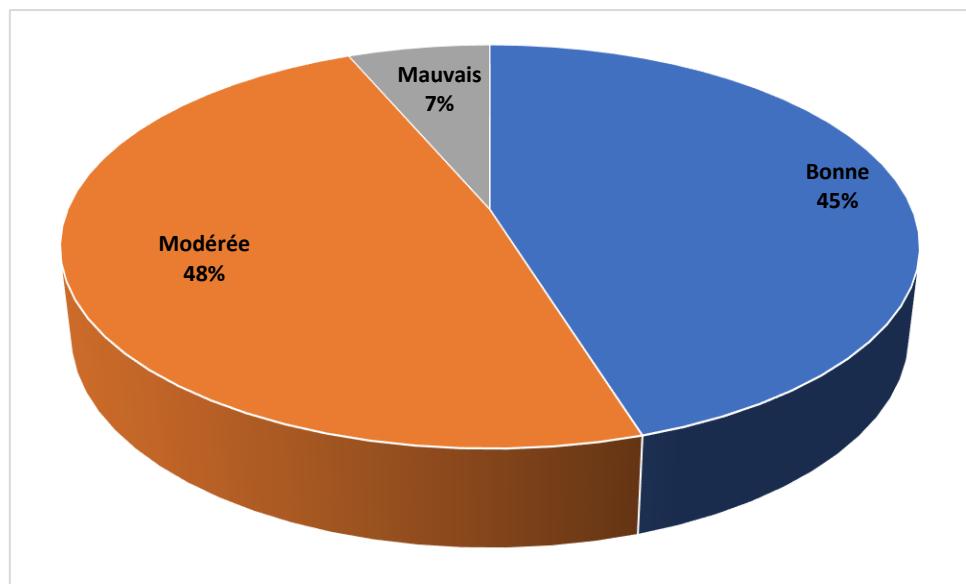
69	Nagao et al [158], 2005	50	Oui	50	Non	-	Non	50	63 (40-84)	35/15	FISH
70	Kim et al [159], 2005	56	Oui	56	Non	-	Non	56	-	45/11	PCR de Sanger
71	Kaku et al [160], 2004	42	Oui	42	Non	-	Non	42	62 (34-83)	29/13	Microsatellite
72	Junker et al [161], 2004	13	Oui	13	Oui	31	Oui	44	-	-	PCR CGH
73	Kallio et al [162], 2004	20	Oui	20	Non	-	Non	20	64 (41-82)		aCGH
74	Junker et al [163], 2003	8	Oui	8	Oui	40	Oui	48	-	-	aCGH
75	Sanz-casla et al [164], 2003	39	Oui	39	Non	-	Non	39	-	-	PCR
76	Yamaguchi et al [165], 2003	50	Oui	50	Non	-	Non	50	62 (40-80)	35/15	FISH
77	Sukosd et al [166], 2003	96	Oui	96	Non	-	Non	96	-	-	Microsatellite
78	Junker et al [167], 2003	82	Oui	82	Non	-	Oui	82	-	-	PCR
79	Yao et al [168], 2002	187	Oui	187	Non	-	Non	187	-	137/50	PCR-SSCP
80	Fukunaga et al [169], 2002	109	Oui	109	Non	-	Non	109	62 (36-88)	74/35	RAP
81	Mitsumori et al [170], 2002	114	Oui	114	Non	-	Non	114	-	-	RAP
82	Kondo et al [171], 2002	240	Oui	240	Non	-	Non	240	-	148/31	Microsatellite
83	Presti et al [172], 2002	72	Oui	72	Non	-	Non	72	-	-	Microsatellite

84	Schrmal et al [173], 2002	113	Oui	113	Non	-	Non	113	-	-	Séquençage Sanger
85	Parry et al [174], 2001	47	Oui	47	Non	-	Non	47	-	-	PCR-SSCP
86	Grady et al [175], 2001	60	Oui	60	Non	-	Non	60	-	-	PCR
87	Reutzel et al [176], 2001	61	Oui	61	Non	-	Non	61	-	-	aCGH
88	Junker et al [177], 2000	46	Oui	15	Oui	46	Non	61	-	-	aCGH
89	Maestro et al [178], 2000	40	Oui	40	Non	-	Non	40	-	-	PCR
90	Bissig et al [179], 1999	19	Oui	19	Oui	32	Oui	51	-	-	aCGH microsatellite
91	Velickovic et al [180], 1999	91	Oui	91	Non	-	Non	91	60	-	Microsatellite
92	Gallou et al [181], 1999	173	Oui	173	Non	-	Non	173	-	-	PCR-SSCP
93	Kawasaki et al [182], 1999	5	Oui	5	Oui	5	Non	dix	58,5 (37-66)	3/2	PCR-SSCP

Note. Liste des 93 études en métá-analyse se trouve dans l'annexe dans l'ordre de 1 à 93

Notre méta-analyse comprenait un total de 37218 patients avec un âge médian au moment du diagnostic de 53,5 ans, et un total de 18932 échantillons, dont 11906 échantillons de tumeurs primitives, 5541 échantillons de métastases extra-cérébrales et 1485 échantillons de métastases cérébrales.

Pour l'évaluation de la qualité, 42 études (45,2%) étaient de bonne qualité, 45 études (48,4%) étaient de qualité modérée, et 6 études (6,4%) étaient de faible qualité (Figure 5, Tableau 4).



*Figure 5. Qualité des études*

Tableau 4. Détails sur les scores de qualité des études incluses, basés sur l'outil Q-genie

Étude	Question											Score
	Justificat ion de l'étude	Sélectio n et résultat	Compar abilité du groupe de comparaison	Exposition technique	Expositi on non techniqu e	Autres sources de biais	Taille et puiss ance de l'écha ntillo n	Planifi cation a priori de l'analy se	Méthodes statistique s et contrôle de la confusion	Test d'hypothè ses et d'inférenc es pour l'analyse génétique	Pertinen ce des déductio ns tirées des résultats	
Hakimi et al [92], 2020	6	5	1	3	2	3	3	5	4	5	5	42
Braun et al [93], 2020	6	4	1	3	3	4	4	4	4	5	5	43
Ferronika et al [94], 2020	6	3	1	3	2	3	1	4	2	4	4	33
Correa et al [95], 2020	6	3	1	2	2	3	2	3	2	4	4	32
Wang et al [96], 2020	6	5	1	3	3	2	4	5	4	5	5	43
Hu et al [97], 2019	6	2	1	3	2	3	3	3	3	3	3	32
Clark et coll. [98], 2019	6	4	1	4	4	3	3	5	3	5	5	43
Nassar et coll. [99], 2019	5	3	1	3	2	3	3	4	2	4	4	34

Nejati et al [100], 2019	4	3	1	2	2	3	2	4	3	4	4	32
Palmbo et al [101], 2019	4	2	1	3	2	3	3	4	3	4	4	33
Zhang et al [102], 2019	4	2	1	2	2	4	2	4	2	5	5	33
Chen et al [103], 2019	3	2	1	1	1	2	1	2	3	2	4	22
Grimm et al [104], 2019	4	2	1	2	2	3	3	4	2	5	5	33
Huang et al [105], 2019	6	4	1	3	2	5	5	5	3	5	6	45
Stenehjem et al [106], 2019	5	2	1	2	2	4	2	4	2	4	4	32
Bihr et al [107], 2019	5	2	1	4	2	3	3	4	3	4	4	35
Li et al [108], 2019	6	3	1	2	2	3	4	4	3	4	4	36
Saeed et al [109], 2019	5	3	1	2	4	3	1	4	2	3	4	32
Voss et al [110], 2018	6	4	1	3	3	4	4	5	2	5	5	42
Warsow et al [111], 2018	6	4	1	3	4	5	1	5	3	5	5	42
de Velasco et al [112], 2018	5	4	1	3	2	4	5	5	3	5	5	42

Turajlic et al [113], 2018	6	5	1	4	2	1	2	6	3	6	6	42
Turajlic et al [114], 2018	6	4	1	4	2	2	3	6	2	6	6	42
Mitchel et al [115], 2018	6	4	1	3	3	5	2	5	2	6	5	42
Nouhaud et al [116], 2018	5	3	1	3	3	5	2	5	2	6	5	40
Manley et al [117], 2017	5	3	1	3	3	4	3	4	3	5	5	39
Becerra et al [118], 2018	6	4	1	4	4	4	2	6	2	6	6	45
Casuscelli et al[119], 2019	6	4	1	4	3	3	3	5	3	5	5	42
Wei et al [120], 2017	5	3	1	2	2	3	2	4	3	4	4	33
Mikhailenko et al [121], 2017	4	2	1	2	2	3	4	1	1	4	4	28
Dagher et al [122], 2017	6	4	1	2	4	3	1	3	2	4	4	34
Li et al [123], 2017	5	2	1	2	3	3	4	4	3	4	4	35
Wang et al [124], 2016	5	2	1	3	2	3	5	4	3	4	4	36
Kouba et al [125], 2016	6	4	1	4	3	4	2	5	3	5	5	42

Razafinjatovo et al [126], 2016	5	4	1	4	2	3	4	4	3	4	4	38
Manley et al [127], 2017	6	4	1	4	4	3	7	4	3	5	5	46
Lim et al [128], 2016	5	2	1	3	3	3	1	4	2	4	4	32
Togo et al [129], 2016	5	2	1	2	4	3	2	3	2	4	4	32
Kohn et al [130], 2015	5	2	1	3	3	4	2	4	2	4	4	34
Kang et al [131], 2015	4	2	1	2	2	1	2	4	2	3	3	26
Kanu et al [132], 2015	6	4	1	4	3	4	3	5	2	5	5	42
Beuselinck et al [133], 2015	6	4	1	4	3	3	3	5	3	5	5	42
Scelo et al [134], 2014	6	4	1	4	4	4	2	4	3	5	6	43
Alves et al [135], 2014	5	3	1	2	2	3	2	4	2	4	4	32
Gerlinger et al [136], 2014	6	4	1	4	3	5	2	5	2	5	5	42
Muscarella et al [137], 2013	5	2	1	3	3	4	1	4	3	4	4	34

Sato et al [38], 2013	6	4	1	4	3	4	3	5	2	5	5	42
TCGA [138], 2013	6	4	1	4	3	4	5	5	2	5	6	45
Peña-Llopis et al [40], 2012	6	4	1	4	4	4	3	4	3	5	5	43
Gerlinger et al [139], 2012	7	5	1	4	3	3	1	5	3	5	5	42
Guo et al [140], 2011	6	4	1	4	3	4	2	5	3	5	5	42
Dondeti et al [141], 2012	6	4	1	4	4	3	2	5	3	5	5	42
Moore et al [142], 2011	5	2	1	2	2	3	5	4	2	5	5	36
Monzon et al [143], 2011	5	4	1	4	4	4	3	5	2	5	5	42
Rechsteiner et al [144], 2011	5	2	1	3	3	3	4	4	2	4	4	35
Varela et al [145], 2011	6	4	1	4	3	4	4	4	2	5	5	42
La Rochelle et al [146], 2010	6	2	1	2	4	3	6	3	2	4	4	37
Kuroda et al [147], 2010	4	2	1	3	3	4	1	4	3	4	4	33
Chen et al [148], 2009	6	2	1	3	3	3	2	4	2	4	4	34

Cheng et al [149], 2008	6	4	1	4	3	5	2	5	2	5	5	42
Arai et al [150], 2008	6	4	1	4	3	4	2	5	3	5	5	42
Nickerson et al [151], 2008	6	4	1	4	4	4	3	5	2	5	5	43
Smits et al [152], 2008	6	4	1	4	3	4	3	4	3	5	5	42
Cifola et al [153], 2008	5	2	1	2	2	4	1	4	2	4	5	32
Yoshimoto et al [154], 2007	4	2	1	2	4	4	1	4	2	4	4	32
Giménez-Bachs et al [155], 2007	5	2	1	3	3	4	2	4	2	4	4	34
Brunelli et al [156], 2008	5	4	1	4	4	5	2	5	2	5	5	42
Hirata et al [157], 2005	4	2	1	2	4	3	2	4	2	4	4	32
Nagao et al [158], 2005	3	2	1	3	3	4	2	3	2	4	5	32
Kim et al [159], 2005	4	2	1	2	3	3	2	5	5	4	4	35
Kaku et al [160], 2004	4	2	1	3	3	4	2	4	3	4	4	34

Junker et al [161], 2004	6	4	1	4	3	5	2	5	3	5	5	43
Kallio et al [162], 2004	3	2	1	2	4	3	1	3	2	3	3	27
Junker et al [163], 2003	5	2	1	3	3	4	2	4	3	4	4	35
Sanz-casla et al [164], 2003	3	2	1	3	2	3	2	4	3	4	4	31
Yamaguchi et al [165], 2003	5	2	1	3	3	3	2	4	2	4	4	33
Sukosd et al [166], 2003	6	5	1	4	4	3	2	5	2	5	5	42
Junker et al [167], 2003	6	4	1	4	3	4	2	5	3	5	5	42
Yao et al [168], 2002	5	4	1	5	3	5	3	5	5	6	5	47
Fukunaga et al [169], 2002	5	2	1	2	4	3	3	4	2	4	4	34
Mitsumori et al [170], 2002	5	4	1	4	4	4	3	5	3	5	5	43
Kondo et al [171], 2002	5	2	1	2	4	3	3	3	2	4	4	33
Presti et al [172], 2002	5	4	1	4	4	4	2	5	3	5	5	42

Schrmal et al [173], 2002	<b>5</b>	4	1	4	4	<b>5</b>	3	5	2	5	5	43
Parry et al [174], 2001	<b>5</b>	4	1	4	4	4	1	5	3	5	5	41
Grady et al [175], 2001	<b>5</b>	4	1	4	4	<b>5</b>	2	5	2	5	5	42
Reutzel et al [176], 2001	3	2	1	2	2	3	2	4	3	4	4	30
Junker et al [177], 2000	<b>5</b>	2	1	2	4	3	2	5	2	5	5	36
Maestro et al [178], 2000	6	2	1	4	2	3	1	4	3	4	4	34
Bissig et al [179], 1999	4	2	1	2	4	3	2	4	2	4	4	32
Velickovic et al [180], 1999	<b>6</b>	4	1	4	3	4	2	5	3	5	5	42
Gallou et al [181], 1999	<b>5</b>	2	1	2	4	4	3	3	2	4	4	34
Kawasaki et al [182], 1999	4	2	1	4	2	4	1	4	3	4	4	33

*Les scores d'une valeur supérieure à 40 sont en gras*

## **Profil mutationnel des ccRCCs primitifs**

Au total, 57 études ont fourni des données sur les mutations géniques. En utilisant un seuil de prévalence des mutations de 1% choisi a priori, l’analyse finale a identifié 51 gènes.

Pour les ccRCCs primitifs, avec un total de 10874 échantillons, la prévalence des mutations géniques varie de 1% à 64%, et la plupart des études sont hétérogènes pour cette analyse (exemple de la prévalence des mutations de *VHL* dans la Figure 6).

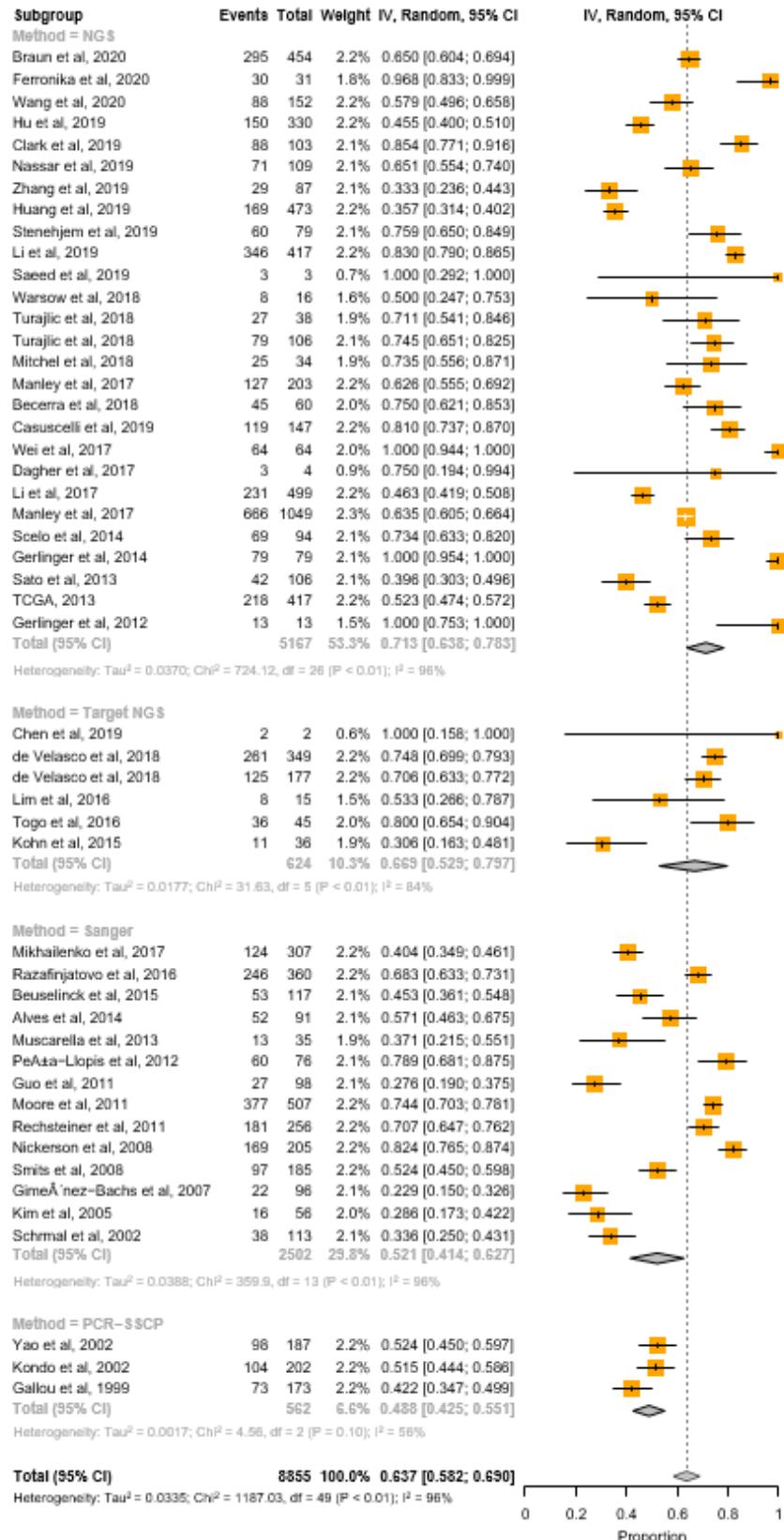


Figure 6. Ce diagramme ou « forest-plot » montre la prévalence des mutations de VHL dans les études en fonction de la méthode de détection utilisée, et objective une grande hétérogénéité de résultats entre les études.

Les quatre gènes les plus fréquemment altérés sont *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, *BAP1* avec une prévalence de mutation de 64%, 36%, 20% et 13% respectivement (Tableau 4). À noter que la prévalence des mutations était également élevée pour *ABCB1*, *TTN*, *MUC4*, *CDK12*, *DNMT3A*, *UGT1A1*, *ERBB3*, à plus de 10%, mais avec seulement une à trois études incluses dans notre méta-analyse (Tableau 5).

*Tableau 5. Prévalence des mutations dans les ccRCC primitifs*

Gene	Taille de l'échantillon n	Etudes	Prévalence des mutations (%)	Test d'hétérogénéité	
			(95% IC)	I <sup>2</sup>	P
<i>VHL</i>	<b>8,855</b>	2,3,5,6,7,8,11,12,14,15,17,18,20,21,22,23,24,26,2 7,28,29,30,31,32,35,36,37,38,39,42,43,44,45,46,4 748,49,50,51,53,55,62,63,66,70,79,82,84,92	<b>64</b> (58-69)	96%	<0,01
<i>PBRM1</i>	<b>6,896</b>	1,2,3,5,6,7,8,12,14,15,16,18, 19,20,21,22,23,24,26,27,28, 29,32,33,36,37,38,42,43,45,47,48,50,51,56	<b>36</b> (33-38)	72%	<0,01
<i>SETD2</i>	<b>6,163</b>	2,5,6,7,8,11,14,15,16,18,19, 8,29,32,36,37,38,41,43,45,47,48,50,51	<b>20</b> (16-23)	92%	<0,01
<i>BAP1</i>	<b>6,033</b>	2,3,5,6,7,8,11,14,15,16,18,19, 20,21,22,23,24,26,27,28,29,32,36,37,38,43,45,47 <sup>4</sup> 8,51	<b>13</b> (11-15)	78%	<0,01
<i>MTOR</i>	4,511	2,3,5,8,14,15,17,18,20,22,23,24,26,27,29,32,36,37 43,45,47,48,50	9 (6-12)	89%	<0,01
<i>KDM5C</i>	4,451	2,3,5,7,8,15,18,19,21,22,23,26,27,29,32,36,37,434 5,48,50	10 (8-13)	87%	<0,01
<i>TP53</i>	4,280	3,5,8,11,15,17,19,20,21,22,23,27,32,36,39,45,47,4 8,50,51,93	7 (5-9)	79%	<0,01
<i>PTEN</i>	3,720	2,5,8,11,20,21,22,23,27,29,32,36,37,39,45,48,50	7 (4-9)	84%	<0,01
<i>PIK3CA</i>	3,485	2,3,5,8,11,17,22,23,27,29,36,37,45,47,48,51	3 (2-5)	77%	<0,01
<i>TSC1</i>	2,676	2,3,5,8,21,22,23,27,36,37,51,85	5 (3-8)	87%	<0,01
<i>TSC2</i>	2,335	5,11,17,22,23,26,27,29,36,45,85	3 (2-4)	59%	<0,01
<i>TET2</i>	2,163	21,23,26,27,36,37,47,51	3 (2-5)	49%	0,05
<i>ARID1A</i>	1,948	1,3,5,14,18,20,23,26,27,37,45,48,51	2 (1-4)	41%	0,03
<i>ATM</i>	1,429	14,17,23,26,27,29,47	4 (3-6)	33%	0,18

<b>TCEB1</b>	1,401	5,17,23,26,47,48	2 (0.7-3)	44%	0,11
<i>TERT</i>	1,218	17,19,24,26,27,28	7 (3-1.3)	89%	<0,01
<i>CSMD3</i>	1,201	3,5,11,14,20,22,23,43,47,51	8 (6-1.2)	60%	<0,01
<i>NOTCH1</i>	778	17,26,27,51	1 (0.1-3)	56%	0,08
<i>EGFR</i>	583	17,23,27	2 (0-7)	82%	<0,01
<i>EP300</i>	583	17,27,47	5 (3-7)	10%	0,33
<i>NFE2L2</i>	583	23,27,48	2 (0.3-4)	34%	0,22
<i>NFI</i>	523	17,23	4 (2-5)	0%	0,33
<i>POLQ</i>	509	17,45,50	4 (0-1.3)	83%	<0,01
<b>ABCB1</b>	<b>504</b>	11,17	<b>19</b> (0-79)	99%	<0,01
<i>ROS1</i>	495	3,15,23,27,37,47,51	4 (0.9-86)	73%	<0,01
<i>BRCA2</i>	477	17,27	2 (0-9)	83%	0,02
<i>PDGFRA</i>	477	17,27	2 (0-9)	83%	0,02
<i>STAG2</i>	477	27,48	1 (0.4-3)	0%	0,76
<i>MLL3</i>	463	26,27,43,47	5 (3-7)	1%	0,39
<i>ATR</i>	417	17	1 (0.3-2)		
<i>BRCA1</i>	417	17	4 (2-6)		
<b>TTN</b>	330	6	<b>18</b> (14-22)		
<i>MLL2</i>	309	26,47	2 (0.8-4)	0%	0,84
<i>NAV3</i>	258	5,23	5 (3-8)	0%	0,47
<i>LRRK2</i>	243	3,23,47	3 (1-6)	0%	0,41
<i>MUC4</i>	228	20,23,47	<b>13</b> (4-36)	93%	<0,01
<i>TSHZ3</i>	212	23,47	2 (0.3-4)	0%	0,35
<b>UGT1A1</b>	181	11,37	<b>17</b> (5-50)	93%	<0,01

<i>KDM6A</i>	166	23,27	4 (1-8)	26%	0,24
<i>ATRX</i>	139	27,45	1 (0-4)	0%	0,82
<i>SF3B1</i>	124	27,29	2 (0.2-6)	0%	0,56
<b><i>CDK12</i></b>	122	20,47	<b>11</b> (0-50)	91%	<0,01
<i>RPL5</i>	122	20,47	7 (0-31)	83%	0,02
<i>SMC3</i>	106	47	2 (0-7)		
<i>TAF1</i>	106	47	3 (0.6-8)		
<i>USP9X</i>	106	47	2 (0.2-7)		
<i>SMC3</i>	106	47	2 (0-7)		
<b><i>DNMT3A</i></b>	76	20,27	<b>11</b> (0-40)	83%	0,02
<b><i>CDKN2A</i></b>	60	27	2 (0-9)		
<i>MAP3K1</i>	60	27	2 (0-9)		
<i>NSD1</i>	60	27	2 (0-9)		
<b><i>ERBB3</i></b>	31	3	<b>16</b> (6-33)		

*IC : intervalle de confiance. Les gènes ayant une prévalence de mutation supérieure à 10 % sont en gras. Les gènes appartenant à la même voie biologique sont de la même couleur (voir ci-dessous Figure 8).*

Ensuite, nous nous sommes focalisés sur les gènes *VHL*, *PBRM1*, *SETD2* et *BAP1* pour des analyses en sous-groupes en utilisant les paramètres suivants : le score de qualité Q-genie (bon vs. Autres), la méthode d'analyse génique (NGS whole exome/genome vs. NGS ciblé vs séquençage Sanger), les conditions de préservation des tumeurs (congelées vs. Fixées en formol) et le nombre d'échantillons analysés pour une même tumeur (unique vs multiples) (Tableau 6).

Lorsque nous avons comparé les études ayant de bons scores de qualité avec les autres études, il y avait une prévalence de mutation accrue uniquement pour *SETD2* (23% vs 13%, P=0,022, Tableau 6).

La NGS était la méthode principalement utilisée pour 67,5% des échantillons. Pour les gènes *VHL* et *SETD2*, elle a entraîné une prévalence de mutation significativement plus élevée que le

séquençage Sanger. En général, pour le gène *VHL*, la prévalence de la mutation était de 71% avec la NGS, contre 52% avec le séquençage Sanger ( $P=0,003$ , Tableau 6).

De manière surprenante, la prévalence des mutations n'était pas significativement différente en utilisant des échantillons congelés par rapport aux tumeurs fixées en formol ou dérivé formolé.

En revanche, l'échantillonnage multiple a significativement augmenté la prévalence des mutations pour les gènes *VHL*, *PBRM1*, *BAP1* et *SETD2*, avec des odds-ratios allant de 1,38 à 3,6 (Tableau 6). Pour le gène *VHL*, la prévalence de la mutation atteignait presque 100 %, passant de 58 % avec une analyse sur échantillon unique à 93% avec un échantillonnage multiple ( $OR=3,6$ ,  $P<0,001$ ).

*Tableau 6. Prévalence des mutations les plus fréquentes dans les ccRCC primitifs selon les analyses en sous-groupes*

Gene	Echantillon s (%)	Etudes	Prévalence de mutations (95%IC)	P value	Test de l'hétérogénéité					
					$I^2$	P				
<b><i>VHL</i></b>										
<b>Méthode d'analyse génique</b>										
NGS	5167 (58,3)	2,3,5,6,7,8,11,14,16,17,18,20,22,23,24,26,27,28,29,31,32,36	<b>71 (64-78)</b>	96%	<0,01					
Sanger	2502 (28,3)	30,35,42,44,46,49,51,53,55,62,63,6670,84	<b>52 (41-63)</b>	0,003	96%	<0,01				
NGS ciblé	624 (7,1)	43,45,47,48,50	<b>67 (53-80)</b>	0,5	84%	<0,01				
PCR-SSCP	562 (6,3)	79,82,73	<b>49 (43-55)</b>	0,054	56%	0,1				
<b>Conditions de préservation de la tumeur<sup>1</sup></b>										
Congelé	3073 (50,3)	5,12,14,30,31,38,39,42,43,44	<b>62 (52-71)</b>	96%	<0,01					
FFPE	3029 (49,7)	2,3,6,7,8,11,15,17,20,22,23,24,35,3746,55,62,6370,84	<b>64 (56-71)</b>	0,7	95%	<0,01				
<b>Échantillons multiples</b>										
Non	8510 (96,1)	2,5,6,7,8,11,14,15,17,18,21,22,26,2728,30,31,32,35,36,37,38,39,42,43,4446,47,48,49,51,53,55,62,63,66,70,7982,84,92	<b>58 (53-63)</b>	95%	<0,01					
Oui	345 (3,9)	3,12,20,23,24,29,45,50	<b>93 (77-100)</b>	<0,001	92%	<0,01				

## Évaluation de la qualité

Bonne	4848 (54,7)	2,5,7,14,20,21,22,23,24,27,28,36,4 2,43,45,47,48,49,50,51,62,63,79,84	<b>66 (59-73)</b>	98%	<0,01
Autres	4007 (45,3)	3,6,8,11,12,15,17,18,26,29,30,31,3 2,35,37,38,39,44,46,53,55,66,70,82 ,92	<b>61 (52-70)</b>	0,3	96% <0,01

## PBRMI

### Méthode d'analyse génique

NGS	5836 (84,6)	1,2,3,5,6,7,8,14,15,16,18,19	<b>37 (34-39)</b>	73%	<0,01
NGS ciblé	588 (8,5)	12,21,37,38	<b>35 (25-46)</b>	0,8	71% <0,01
Sanger	472 (6,9)	42,51,56	<b>30 (22-37)</b>	0,085	65% 0,06

### Conditions de préservation de la tumeur<sup>1</sup>

Congelé	1490 (43,3)	5,12,14,38,42,43,45,48,50,51	<b>33 (30-38)</b>	55%	0,02
FFPE	1944 (56,6)	1,2,3,6,7,8,15,16,19,20,22,23	<b>39 (34-44)</b>	0,7	76% <0,01

## Échantillons multiples

Non	6551 (95,0)	1,2,5,6,7,8,14,15,16,18,19,21	<b>35 (34-36)</b>	70%	<0,01
Oui	345 (5,0)	3,12,20,23,24,29,45,50	<b>42 (33-54)</b>	0,043	76% <0,01

## Évaluation de la qualité

Bonne	4885 (70,8)	1,2,5,7,14,19,29,21,22,23,24,27,36, 42,45,47,48, 50,51,56	<b>37 (34-40)</b>	74%	<0,01
Autres	2011 (29,2)	3,6,8,12,15,16,18,26,29,32,33,37,3 8	<b>32 (28-36)</b>	0,11	58% <0,01

## SETD2

### Méthode d'analyse génique

NGS	5479 (88,9)	2,5,6,7,8,11,14,15,16,18,19,20,22,2 324,26,27,28,29,32,36,41,43,45,47, 4850	<b>20 (16-24)</b>	92%	<0,01
-----	-------------	-----------------------------------------------------------------------------------	-------------------	-----	-------

Target NGS	586 (9,5)	21,37,38	<b>25</b> (20-31)	0,5	36%	0,19
Sanger	98 (1,6)	51	<b>04</b> (1-10)	0,049		

#### Conditions de préservation de la tumeur<sup>1</sup>

Congelé	1371 (43,1)	5,14,38,43,45,48,50,51	<b>19</b> (11-28)	92%	<0,01
FFPE	1811 (56,9)	2,6,7,8,11,15,16,19,20,22,23,37	<b>23</b> (16-31)	0,9	92% <0,01

#### Échantillons multiples

Non	5810 (94,9)	2,5,6,7,8,11,14,15,16,18,19,21,22,2 627,28,32,36,37,38,41,43,47,48,51	<b>16</b> (13-19)	89%	<0,01
Oui	312 (5,1)	20,23,24,29,45,50	<b>46</b> (26-67) <0,001	92%	<0,01

#### Evaluation de la qualité

Bonne	4646 (74,4)	2,5,7,14,19,20,21,22,23,24,27,28,3 6,41,43,45,47,48,50,51	<b>23</b> (18-28)	74%	<0,01
Autres	1517 (24,6)	6,8,11,15,16,18,26,29,32,37,38	<b>13</b> (8-18) 0,022	58%	<0,01

#### BAPI

#### Méthode d'analyse génique

NGS	5349 (88,7)	2,3,5,6,7,8,11,14,15,16,18,19	<b>13</b> (11-16)	81%	<0,01
NGS ciblé	586 (9,7)	21,37,38	<b>13</b> (10-16)	0,7	0% 0,9
Sanger	98 (1,6)	51	<b>9</b> (4-17) 0,4		

#### Conditions de préservation de la tumeur<sup>1</sup>

Congelé	1534 (45,4)	5,14,38,43,45,48,51	<b>11</b> (9-14)	56%	0,02
FFPE	1842 (54,6)	2,3,6,7,8,11,15,16,19,20,22,23,24,3 7	<b>16</b> (11-21) 0,3	85%	<0,01

#### Échantillons multiples

Non	5703 (94,5)	2,5,6,7,8,11,14,16,18,19,21,22,26,2 7,28,32,36,37,38,43,47,48,51	<b>12</b> (10-14)	75%	<0,01
Oui	330 (5,5)	3,20,23,24,29,45	<b>24</b> (20-29) <0,001	0% 2,69	

#### Evaluation de la qualité

Bonne	4485 (74,3)	2,5,7,14,19,20,21,22,23,24,27,28,3 6,43,45,47,48,51	<b>14</b> (12-17)	76%	<0,01
-------	-------------	--------------------------------------------------------	-------------------	-----	-------

Autres	1 548 (25,7)	3,6,8,11,15,16,18,26,29,32,37,38	<b>11</b> (7-15)	0,2	79%	<0,01
--------	-----------------	----------------------------------	------------------	-----	-----	-------

*ns : non significatif, NGS : séquençage de nouvelle génération, FFPE : inclusion en paraffine des tissus fixés au formol, PCR-SSCP : Réaction de polymérisation en chaîne – Polymorphisme de conformation en brin simple, IC : intervalle de confiance*

<sup>1</sup>Ajusté avec les méthodes de détection des mutations géniques.

Lorsque nous avons restreint ces analyses de sous-groupes (méthode d'analyse génique, conditions de préservation des tumeurs et nombre d'échantillons) aux 42 articles avec des scores de haute qualité et aux 8318 échantillons (54,6 % du total des échantillons), l'échantillonnage multiple a encore augmenté les valeurs de prévalence des mutations (Tableau 7).

*Tableau 7. Prévalence des mutations courantes dans les ccRCCs primitifs selon les analyses de sous-groupes, mais restreintes aux 42 articles de qualité élevée.*

Gene	Echantillons (%)	Etudes	Prévalence des mutations (95% IC)	P value	Test de l'hétérogénéité					
					I <sup>2</sup>	P				
<b>VHL</b>										
<b>Méthode d'analyse génique</b>										
NGS	3341 (68,9)	2,5,7,14,29,22,23,24,27,28,3 6,43,45,47,48, 50	<b>70</b> (61-79)	96%	<0,01					
Sanger	794 (16,4)	42,49,51,62,63,64	<b>54</b> (35-73)	0,072	97%	<0,01				
NGS ciblé	526 (10,8)	21	<b>73</b> (69-77)	0,8	5%	0,31				
PCR- SSCP	187 (3,9)	79	<b>52</b> (45-60)	0,3						
<b>Conditions de préservation de la tumeur<sup>1</sup></b>										
Congelé	1706 (67,6)	5,14,42,43,45,48,49,50,51,79	<b>65</b> (50-78)	97%	<0,01					
FFPE	1254 (42,4)	2,7,20,22,23,24,62,63,84	<b>66</b> (55-77)	0,9	93%	<0,01				
<b>Échantillons multiples</b>										

Non	4600 (94,8)	2,5,7,14,21,22,27,28,36,42,4 3,47,48,49,51,62,63,79,84	<b>61 (54-68)</b>		96%	<0,01
Oui	248 (3,9)	20,23,24,45,50	<b>85 (61-99)</b>	0,004	93%	<0,01

### PBRMI

#### Méthode d'analyse génique

NGS	3887 (79,6)	1,2,5,7,14,19,20,22,23,24,27, 28,36,43,45, 47,48,50	<b>39 (36-43)</b>		73%	<0,01
NGS ciblé	526 (10,8)	21	<b>34 (24-45)</b>	0,3	71%	<0,01
Sanger	472 (9,7)	42,51,56	<b>30 (22-37)</b>	0,025	65%	0,06

#### Conditions de préservation de la tumeur<sup>1</sup>

Congelé	1443 (52,7)	5,14,42,43,45,48,50,51	<b>33 (30-38)</b>		48%	0,08
FFPE	1297 (47,3)	1,2,7,8,19,20,22,23,24	<b>39 (34-44)</b>	0,030	79%	<0,01

#### Échantillons multiples

Non	4637 (94,9)	1,2,5,7,14,19,21,22,27,28,36, 42,43,47,48, 51,56	<b>36 (33-39)</b>		71%	<0,01
Oui	248 (5,1)	20,23,24,45,50	<b>46 (35-58)</b>	0,009	63%	0,03

### SETD2

#### Méthode d'analyse génique

NGS	4022 (86,6)	2,5,7,14,19,20,22,23,24,27,28 .36,41,43,45, 47,48,50	<b>24 (19-30)</b>		92%	<0,01
NGS ciblé	526 (11,3)	21	<b>27 (22-33)</b>	0,7	40%	0,20
Sanger	98 (2,1)	51	<b>04 (1-9)</b>	0,029		

#### Conditions de préservation de la tumeur<sup>1</sup>

Congelé	1326 (54,6)	5,14,43,45,48,50,51	<b>19 (11-29)</b>		93%	<0,01
FFPE	1108 (45,5)	2,7,19,20,22,23,24	<b>31 (22-40)</b>	0,2	88%	<0,01

#### Échantillons multiples

Non	5810 (94,9)	2,5,6,7,8,11,14,15,16,18,19,2 1,22,26,27,28,32,36,37,38,41 ,43,47,48,51	<b>16 (13-19)</b>	89%	<0,01
Oui	312 (5,1)	20,23,24,29,45,50	<b>46 (26-67)</b>	<0,001	92% <0,01

### BAP1

#### Méthode d'analyse génique

NGS	3861 (86,7)	2,5,6,14,19,20,22,23,24,27,2 8,36,45,47,48	<b>15 (12-18)</b>	81%	<0,01
NGS ciblé	586 (9,7)	21	<b>14 (11-17)</b>	0,8	0% 0,8
Sanger	98 (1,6)	51	<b>9 (4-16)</b>	0,3	

#### Conditions de préservation de la tumeur<sup>1</sup>

Congelé	1489 (57,3)	5,14,43,45,48,51	<b>12 (9-15)</b>	64%	0,01
FFPE	1108 (42,7)	2,3,6,7,8,11,15,16,19,20,22,2 3,24,37	<b>19 (12-27)</b>	0,066	89% <0,01

#### Échantillons multiples

Non	4250 (94,7)	2,5,7,14,19,21,22,27,28,36,4 3,47,48,51	<b>13 (11-15)</b>	72%	<0,01
Oui	235 (5,3)	20,23,24,45	<b>26 (20-32)</b>	<0,001	0% 2,69

ns : non significatif, NGS : séquençage de nouvelle génération, FFPE : inclusion en paraffine des tissus fixés au formol, PCR-SSCP : Réaction de polymérisation en chaîne – Polymorphisme de conformation en brin simple, IC : intervalle de confiance

<sup>1</sup>Ajusté avec les méthodes de détection des mutations géniques.

### Certaines mutations « se propagent » dans les métastases du RCC

Pour les métastases du ccCCR, 433 échantillons ont été analysés, ce qui représente 5 des 93 études de cette méta-analyse.

Les données ont été obtenues par l'analyse d'un seul échantillon dans 4 des 5 études. En utilisant un seuil de 1 % pour la prévalence des mutations, 31 gènes ont été retenus pour l'analyse finale. Ces 31 gènes ont également été identifiés dans les ccCCR primitifs. Dans les échantillons métastatiques, la prévalence des mutations variait de 2 % à 75 %. Les quatre gènes les plus fréquemment mutés étaient également *VHL*, *PBRM1*, *SETD2* et *BAP1* avec une prévalence de mutation de 75 %, 41 %, 27 % et 18 %, respectivement (Tableau 8).

Tableau 8. Prévalence des mutations dans les métastases de ccRCCs

Gene	Echantillons (%)	Etudes	Prévalence (95% CI)	Test de l'hétérogénéité	
				I <sup>2</sup>	P
<i>TP53</i>	429	21,22,27,93	11 (6-17)	47%	0,11
<i>VHL</i>	428	21,22,27,31	75 (70-79)	0%	0,47
<i>PBRM1</i>	424	21,22,27	41 (35-48)	42%	0,16
<i>SETD2</i>	424	21,22,27	27 (16-40)	0%	0,43
<i>BAP1</i>	424	21,22,27	18 (12-24)	60%	0,06
<i>KDM5C</i>	424	21,22,27	14 (11-18)	0%	0,85
<i>TSC1</i>	424	21,22,27	7 (4-9)	0%	0,51
<i>PTEN</i>	424	21,22,27	8 (2-17)	85%	<0,01
<i>TET2</i>	369	21,27	6 (2-12)	72%	0,03
<i>MTOR</i>	115	22,27	12 (7-19)	0%	0,86
<i>TSC2</i>	115	22,27	2 (0-13)	80%	0,03
<i>PIK3CA</i>	115	22,27	0,5 (0-4)	10%	0,29
<i>ARID1A</i>	60	27	10 (4-20)		
<i>TERT</i>	60	27	8 (3-18)		
<i>NOTCH1</i>	60	27	2 (0-9)		
<i>APC</i>	60	27	2 (-9)		

<i>ATM</i>	60	<sup>27</sup>	8 (3-18)
<i>ATRX</i>	60	<sup>27</sup>	3 (4-12)
<i>BRCA2</i>	60	<sup>27</sup>	3 (4-12)
<i>CDKN2A</i>	60	<sup>27</sup>	2 (0-9)
<i>DNMT3A</i>	60	<sup>27</sup>	2 (0-9)
<i>EGFR</i>	60	<sup>27</sup>	2 (0-9)
<i>EP300</i>	60	<sup>27</sup>	2 (0-9)
<i>KDM6A</i>	60	<sup>27</sup>	2 (0-9)
<i>MLL3</i>	60	<sup>27</sup>	8 (3-18)
<i>NFE2L2</i>	60	<sup>27</sup>	2 (0-9)
<i>NSD1</i>	60	<sup>27</sup>	2 (0-9)
<i>PDGFRA</i>	60	<sup>27</sup>	2 (0-9)
<i>SF3B1</i>	60	<sup>27</sup>	5 (1-14)
<i>STAG2</i>	60	<sup>27</sup>	3 (4-12)

Lorsque nous avons comparé les tumeurs primitives aux métastases, nous avons observé que la prévalence des mutations était significativement plus élevée pour *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, *BAP1*, *KDM5C*, *TP53*, *PTEN*, *TSC1*, *TET2* et *ARID1A*. Pour *VHL*, elle a augmenté de 64 % à 75 % (P<0,001). En revanche, pour *PIK3CA*, elle a diminué significativement, passant de 3 % à 0,5 % (Figure 7).

A

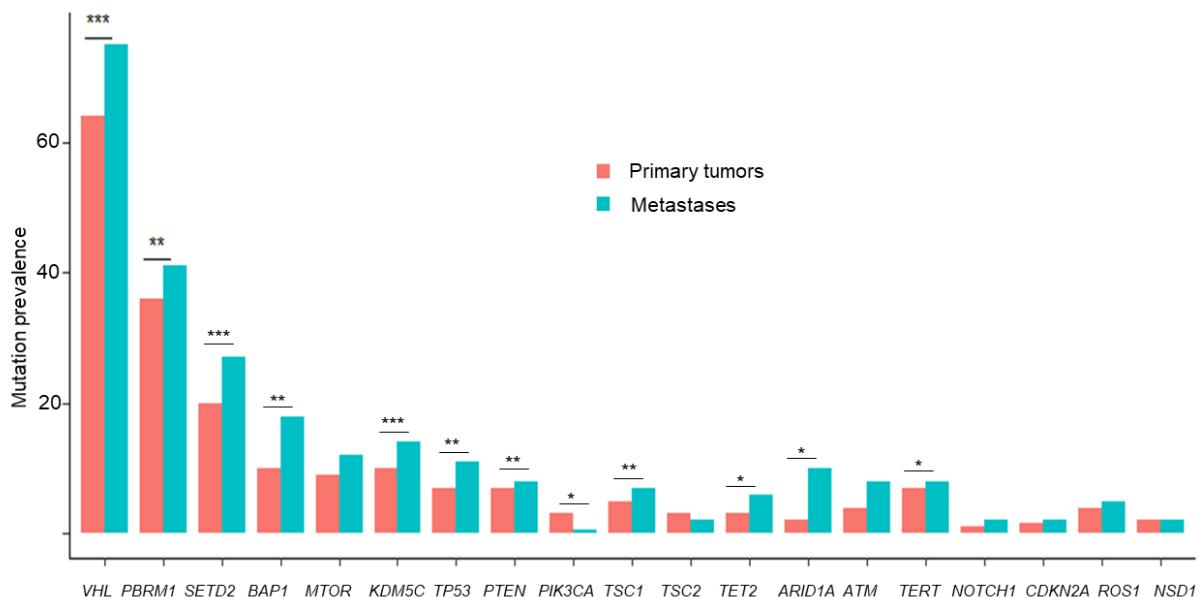


Figure 7. Prévalence cumulée des mutations dans les tumeurs primitives et les métastases de 14696 patients avec un ccRCC

Parmi ces 433 échantillons, un échantillon de tumeur primitive et une métastase appariés provenant des mêmes patients n'étaient retrouvés que pour 107 patients, avec un total de 124 échantillons. Lorsque nous avons comparé ces tumeurs primitives et les métastases chez ce nombre limité de patients, il y avait une augmentation de la prévalence dans les métastases pour les gènes les plus fréquemment mutés, sans obtenir néanmoins de significativité statistique (Figure 8).



Figure 8. Prévalence cumulée des mutations dans les tumeurs primitives et les métastases appariées de 107 patients atteints de ccRCCs métastatiques

## **Pertes d'hétérozygotie (LOH) et altérations du nombre de copies (CNA) dans les ccRCCs primitifs et les métastases**

Au total, 51 études ont fourni des données sur les pertes d'hétérozygotie et les altérations du nombre de copies (CNA).

Pour les ccRCCs primitifs, avec un total de 6018 échantillons et 4994 patients, la prévalence des LOH et des CNA variait de 5 % à 99 %. Les quatre pertes de chromosome les plus fréquemment identifiées étaient 3p25.3, 4q, 6q22.33 et 8p23.2, avec des taux de 85 %, 41 %, 34 % et 34 % respectivement. Les quatre gains de chromosome les plus fréquemment identifiés étaient 5q35.3, 7q22.3, 8q24.21 et 20q13.33, avec des taux de 71 %, 54 %, 35 % et 44 % respectivement. De plus, une LOH du 3p a été rapportée dans 86 % des cas.

Pour les métastases, un total de 307 échantillons ont été analysés chez 227 patients. Les taux de LOH et de CNA variaient de 5 % à 99 %. Les quatre pertes de chromosome les plus fréquentes étaient 3p25.3, 9p21.3, 3p et 9, avec des taux de 85 %, 76 %, 64 % et 34 % respectivement. Les quatre gains de chromosome les plus fréquents étaient 1q21.3, 7q36.3, 20q11.21 et 5, avec des taux de 61 %, 57 %, 50 % et 34 % respectivement. De plus, la LOH du 3p a été rapportée dans 19 % des cas, mais avec un petit nombre de 32 échantillons.

Lorsque nous avons comparé les RCC primitifs et les métastases, nous avons montré une augmentation significative de la prévalence des pertes de chromosome 1p36.11, 9p21.3 et 18 et des gains de chromosome 1q21.3, 7q36.3, 8q et 20q11.21. En revanche, en ce qui concerne la perte du chromosome 3p, elle a diminué de manière significative de 84 % à 64 % (Figure 9). En particulier, *ARID1A*, situé sur le locus 1p36.11 et perdu dans 54 % des ccRCCs métastatiques, était également plus fréquemment muté dans les métastases par rapport aux RCC primitifs (10 % vs 1,7 %, P=0,019) (Figure 8). *CDKN2A*, également appelé p16 et situé sur le locus 9p21.3 est perdu dans 76 % des échantillons métastatiques. En revanche, nous avons montré un gain du nombre de copies pour *SETDB1* situé sur 1q21.3 et amplifié dans 61 % des RCC métastatiques. Tant la perte de p16 que l'amplification de *SETDB1* sont impliquées dans la progression du cycle cellulaire (Figure 10D). *ASXL1*, situé sur 20p11.21, et amplifié dans 50 % des RCC métastatiques par rapport à 21 % des tumeurs primitives (P<0,001), est étroitement lié à la fonction de BAP1 (Figure 10B).



Figure 9. Prévalence cumulée des LOH et des CNA dans les tumeurs primitives et les métastases de 14696 patients avec un ccRCC

### 1.3. Discussion et conclusion

Nous rapportons ici la première méta-analyse sur les données génomiques des ccRCC. Elle fournit une prévalence des mutations et altérations génétiques plus fiable que les données obtenues de sources individuelles.

Les quatre gènes les plus fréquemment mutés sont *VHL*, *PBRM1*, *SETD2* et *BAP1* :

- *VHL* est un gène suppresseur de tumeur situé sur le chromosome 3p. Il est muté dans 93% des ccRCC primitifs en cas d'échantillonnage multiple et est donc au cœur de la cancérogenèse du ccRCC (Figure 9A). La protéine VHL est reconnue par le complexe E3 ligase, comprenant TCEB1 et CUL2. *TCEB1*, aussi appelé *ELOC* (*Elongin-C*) et situé sur le chromosome 8q21.11, est muté dans 2% des cas ou déleté dans 19% des cas dans notre méta-analyse : il pourrait ainsi participer à l'inactivation du complexe VHL, et expliquer pour partie la cancérogenèse du ccRCC par l'inactivation de la voie VHL [38]. Le complexe VHL cible les sous-unités  $\alpha$  des facteurs induits par l'hypoxie (HIF), HIF1 $\alpha$  et HIF2 $\alpha$ , pour permettre leur dégradation médiée par l'ubiquitine dans la voie du protéasome [39]. En cas d'inactivation de *VHL* (mutation, perte 3p, hyperméthylation du promoteur) ou de mutation des membres du complexe *VHL*, HIF1 $\alpha$  s'accumule dans le

cytoplasme et forme des hétérodimères avec HIF1 $\beta$  [39]. Ce complexe HIF1 $\alpha$  -HIF1 $\beta$  agit alors comme un facteur transcriptionnel activant la transcription de tout un ensemble de gènes dont des gènes pro-angiogéniques, le premier d'entre eux VEGFA.

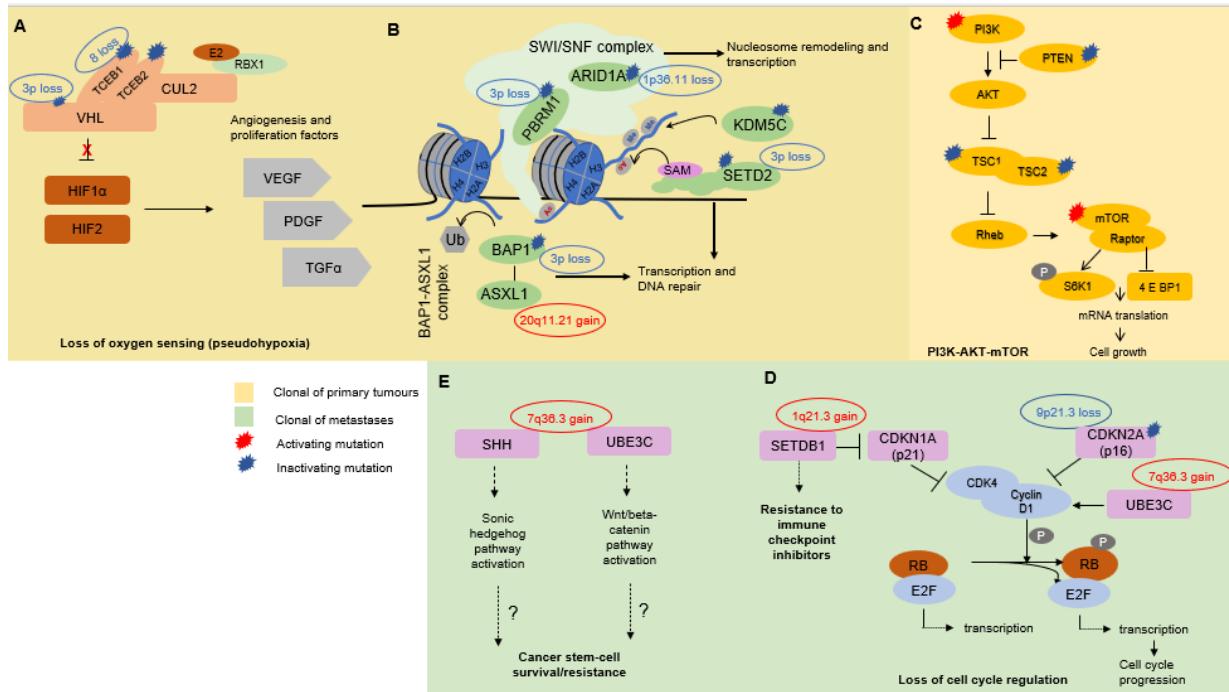


Figure 10. Principales altérations géniques et voies de signalisation impliquées dans la carcinogenèse du ccRCC

Les trois autres gènes les plus fréquemment mutés, *PBRM1*, *SETD2* et *BAP1*, sont également situés sur le chromosome 3p. Tous les trois sont des modificateurs chromatiniens, contribuant à la réparation de l'ADN et à la régulation transcriptionnelle (Figure 10B). Ce sont des événements précoces de la cancérogenèse du ccRCC, et leur perte favorise l'instabilité génétique. Les mutations de *BAP1* et *PBRM1* sont généralement exclusives [40].

- *PBRM1* code pour la sous-unité BAF180 ciblant la chromatine dans le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF dépendant de l'ATP, impliqué dans la prolifération, la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN [41]. Outre le remodelage de la chromatine, les modifications des histones pourraient également jouer un rôle essentiel[42].
- *SETD2* (domaine SET contenant la protéine 2) est une méthyltransférase responsable de la triméthylation des résidus lysine 36 sur l'histone H3 (c'est-à-dire H3K36me3), elle-même impliquée dans la régulation de la transcription et la médiation de la réparation des dommages à l'ADN [43].

- BAP1 est une enzyme dé-ubiquitinante de localisation nucléaire qui agit comme un suppresseur de tumeur : sa fonction est de dé-ubiquitinier le régulateur transcriptionnel HCF1 impliqué dans le remodelage de la chromatine, la régulation des facteurs de transcription de la famille E2F et la régulation du cycle cellulaire en aval. Par conséquent, la perte de BAP1 conduit à la prolifération cellulaire et à la tumorigenèse [44]

Dans notre méta-analyse, sept autres gènes ont une prévalence de mutations de plus de 10%, mais n'ont été identifiés que dans une étude pour *TTN* et *ERBB3*, deux études pour *ABCB1*, *CDK12*, *DNMT3A* et *UTGA1*, et trois études pour *MUC4*.

- *ABCB1*, situé sur le locus 7q21.1, code pour la Pgp (P-glycoprotéine), qui est un transporteur membranaire bien connu, notamment pour les xénobiotiques. Dans l'étude de Zhang et al., la prévalence des mutations d'*ABCB1* était retrouvée dans 50% des 87 ccRCCs étudiés, tous survenus chez des patients chinois [102] Dans une deuxième étude de Li et al., la prévalence des mutations de *ABCB1* n'était que de 2 %, dans 417 ccRCCs analysés, mais dans une cohorte Nord-américaine cette fois [108] Une observation similaire a été faite pour les deux études évaluant la prévalence des mutation d'*UGT1A1*. Ces taux élevés de prévalence de mutations pour *ABCB1* et *UGT1A1* dans les ccRCCs obtenus chez des patients chinois pourraient être expliqués à une génétique de population singulière, et mériteraient des travaux complémentaires ou des analyses comparatives avec des conditions de prélèvements harmonisées et la même technique d'analyse.

Un résultat important de notre méta-analyse est que les échantillons fixés en formol ou dérivés formolés ont fourni des données fiables sur la prévalence des mutations génétiques, permettant leur qualification pour l'utilisation du séquençage à haut débit dans le cadre du soin courant, tout au moins pour les gènes les plus fréquemment altérés. Cependant, il faut garder à l'esprit que la fixation en formol peut entraîner une sous-détection de certaines anomalies, en raison de modifications conformationnelles de l'ADN et de cassures de l'ADN [183]. Les échantillons congelés constituent pour l'instant le système de référence à des fins de recherche [184].

Notre méta-analyse a également confirmé la valeur ajoutée de séquencer de multiples échantillons d'une même tumeur pour éviter une sous-estimation de la prévalence des mutations en général, ce qui s'explique aisément par la forte hétérogénéité tumorale spatiale des ccRCCs déjà largement décrite. En effet, les ccRCCs primitifs comprennent généralement des mutations clonales, sous-clonales et des mutations dites exclusives, ce qui rend difficile la détection des mutations pour les clones minoritaires [185]. Notre méta-analyse a confirmé que le séquençage

de plusieurs régions distinctes d'une même tumeur primitive augmentait significativement la probabilité de détection des mutations clonales, et c'est particulièrement vrai pour les quatre gènes les plus fréquemment mutés que sont *VHL*, *PBRM1*, *SETD2* et *BAP1*. Étonnamment, nous n'avons pas retrouvé le même résultat pour la plupart des variants, ce qui pourrait être une limitation de notre méta-analyse. Dans notre méta-analyse, seulement 8 des 93 études incluses ont effectué des analyses à partir d'un échantillonnage multiple, correspondant à 169 patients (1,1% du nombre total de patients dans cette méta-analyse) et 345 échantillons. De fait, pour les variants/mutations de faible prévalence, l'absence de bénéfice observé de l'échantillonnage multiple pourrait être simplement lié à une couverture insuffisante [185], avec la sous-estimation de la détection de mutations sous-clonales ou exclusives. Une méthode alternative à l'échantillonnage multiple est la méthode Req-Seq qui regroupe des échantillons d'une même tumeur en une seule analyse et offre des premiers résultats prometteurs [186].

Une forte valeur ajoutée de notre méta-analyse est que nous avons comparé les données génomiques obtenues à partir de ccRCCs primitifs et de métastases. C'est en effet d'une importance majeure puisque les cellules métastatiques peuvent dériver de clones minoritaires dans la tumeur primitive [46], A fortiori dans les ccRCCs dont la forte hétérogénéité spatiale au sein d'une même tumeur est une caractéristique fréquente. Dans notre méta-analyse, nous avons constaté que toutes les altérations génétiques identifiées dans les échantillons métastatiques avaient déjà été identifiées dans les tumeurs primitives, mais avec des variations significatives pouvant avoir des implications pronostiques et thérapeutiques :

- Les altérations du gène *VHL* ne semblent pas avoir de valeur pronostique, ni prédire la réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-angiogéniques (ITK) [187]. En fait, comme on l'a vu, si l'on prend en compte les différents types d'altérations – mutations ponctuelles et perte du 3p chez près de 90% des patients, et modulation épigénétique avec hyperméthylation du promoteur de *VHL* chez 8% des patients atteints de ccRCC – ainsi que la question de l'hétérogénéité spatiale, l'expression de *VHL* est presque constamment perdue dans les ccRCCs notamment métastatiques [151]. Bien que nous n'ayons pas intégré cet élément dans notre méta-analyse, les modifications épigénétiques ont des implications majeures dans la cancérogenèse du ccRCC. Un sous-groupe de 37% de ccRCCs avec une hyperméthylation accrue de l'ADN peut être identifié, et il est associé à des mutations plus fréquentes de *SETD2*, à un potentiel métastatique accru et à une survie plus courte [188]. La meilleure connaissance de l'épigénétique des tumeurs

avec l'identification de gènes cibles de plus en plus nombreux ouvre des perspectives de recherche translationnelle en thérapie génique.

- *PBRM1*, *BAP1*, *SETD2*, *KDM5C* et *TP53* ont été assez largement étudiés pour essayer d'établir un lien entre la présence d'altérations génétiques et la réponse au traitement dans le ccRCC métastatique. La perte de fonction de *PBRM1* semble prédictive de la réponse aux ITK anti-angiogéniques et pourrait donc être associée à un meilleur pronostic chez les patients métastatiques [189–192], tandis que la présence de mutations *PBRM1* dans les formes localisées opérées est associée à un risque métastatique accru et de fait à un pronostic plus sombre [193]. Pour les inhibiteurs du point de contrôle, malgré des données limitées et des résultats contradictoires, il semble que le traitement par nivolumab soit associé à une meilleure survie chez les patients porteurs de mutations de *PBRM1* [93,192,194,195]. En fait, les mutations de *PBRM1*, *SETD2*, *BAP1*, *TP53* et *KDM5C* pourraient être associées à différents profils d'infiltrats immunitaires dans la tumeur, ce qui expliquerait différents types de réponses aux immunothérapies en fonction du statut mutationnel [196]. Comme dans le cas de *PBRM1*, les mutations de *BAP1* et *TP53* pourraient être associées au risque métastatique [92,197]. Cependant, leur perte de fonction est plutôt associée à une résistance aux ITK anti-angiogéniques [190,191]. D'autres études sont nécessaires pour confirmer ces résultats susceptibles de permettre une meilleure adaptation des traitements du ccRCC localisé ou métastatique. Une nouvelle classification en 4 groupes a d'ailleurs été élaborée intégrant le statut mutationnel de *BAP1*, *TP53* et *PBRM1*. Cette nouvelle classification pronostique combinant paramètres clinico-biologiques et génétiques est plus performante que la classification purement clinico-biologique [198], et pourrait être utilisée pour de futurs essais cliniques sur le ccRCC métastatique. Le statut mutationnel de *BAP1*, *TP53* et *PBRM1* obtenu sur les tumeurs primitives pourrait également être intégré aux décisions thérapeutiques dans le contexte adjuvant lorsqu'un traitement par sunitinib [199] ou par immunothérapie type pembrolizumab est discuté [75] .

Deux autres gènes mis en lumière par notre méta-analyse mérite d'être discutés, tous deux étant impliqués dans la voie de signalisation PBRM1-SETD2-BAP1 et retrouvés plus fréquemment altérés dans les métastases par rapport aux tumeurs primitives: *ASXL1* et *ARID1A*. *ASXL1* est amplifié dans 50% des cas et *ARID1A* perdu dans 54% des ccRCC métastatiques de notre étude.

- *ASXL1*, situé sur le locus 20p11.21, est la sous-unité régulatrice d'un complexe déubiquitinase, dont la sous-unité catalytique est *BAP1*. *ARID1A*, situé sur le locus

1p36.11, code pour une sous-unité du complexe SWI/SNF. Nos résultats, suggérant un rôle de la perte de *ARID1A* dans la progression métastatique des ccRCCs, concordent avec l'observation d'une sous-expression fréquente d'*ARID1A* dans 404 ccRCCs primitifs, elle-même associée à un mauvais pronostic [200,201]. Les mutations *ARID1A* sont fréquemment observées dans les cancers de l'ovaire et de l'estomac, et la perte de fonction de *ARID1A* est également associée à un mauvais pronostic dans ces autres types de cancers [202]. Dans le futur, l'utilisation de modulateurs de l'épigénétique pourraient avoir un intérêt pour cibler ce type d'altérations.

En revanche, dans notre méta-analyse, la prévalence des mutations de *PIK3CA* diminue de manière significative dans les ccRCC métastatiques. Cela pourrait être contre-intuitif puisque les mutations de *PIK3CA* sont classiquement associées à la propagation métastatique dans d'autres types de cancers tels que le cancer du sein [203].

- En réalité, la voie PIK3CA-AKT-mTOR est fréquemment altérée dans les ccRCCs, dans 25 % à 30 % des tumeurs primitives et des métastases (Figure 10C). En règle générale, nous avons montré que la diminution de la prévalence de la mutation *PIK3CA* était potentiellement compensée par une augmentation significative de la prévalence des mutations de *mTOR* (de 9% dans les tumeurs primitives et 12% des métastases). Les mutations activatrices dans la voie mTOR, y compris les mutations *MTOR*, *TSC1*, *TSC2*, *NF1*, *PIK3CA*, semblent être associées à une plus grande sensibilité à l'éverolimus [128]. Les inhibiteurs de mTOR sont toujours actuellement approuvés pour le traitement des ccRCC métastatiques, mais avec un faible bénéfice [204]. Leur prescription pourrait être réévaluée à la lumière du statut mutationnel.

*SHH* et *UBE3C*, localisés sur le locus 7q36.3 (Figure 4E), sont amplifiés dans 57% des ccRCC métastatiques contre 17% des tumeurs primitives dans notre méta-analyse. L'expression de SHH [205] et UBE3C [196], par l'activation des voies sonic-hedghog et Wnt/bêta-caténine respectivement, pourrait être associée à l'expansion des cellules souches cancéreuses, elles-mêmes connues pour être associées à la résistance aux médicaments et à la progression métastatique [206][207,208].

*CDKN2A*, également appelé p16, est perdu dans 76% des ccRCCs métastatiques dans notre méta-analyse, et *SETDB1* est amplifié dans 61% des ccRCC métastatiques. Ces deux gènes/protéines sont généralement liés à la signature métastatique (Figure 4D). p16 a un effet inhibiteur sur CDK4 et cycline D1, qui sont tous deux des acteurs du cycle cellulaire et jouent un rôle clé dans

la progression métastatique de diverses tumeurs malignes. SETDB1, par inhibition de CDKN1A/p21, active le complexe CDK4/cycline D1. Les inhibiteurs de CDK4/6 sont actuellement approuvés dans le traitement du cancer du sein métastatique [209,210]. Le palbociclib fait actuellement l'objet d'essais cliniques utilisant le séquençage tumoral pour le traitement personnalisé de divers cancers, y compris le cancer du rein métastatique. Des essais cliniques personnalisés similaires pourraient également être utiles pour évaluer les avantages du ciblage de mutations rares lorsqu'un médicament spécifique est disponible. De plus, l'expression de SETDB1 semble être étroitement liée à la résistance aux inhibiteurs du point de contrôle immunitaire comme le nivolumab ou le pembrolizumab [211], et pourrait donc être une cible à discuter pour le traitement du ccRCC métastatique.

Notre méta-analyse présente certaines limites. Elle a été réalisée sur des données publiées et non sur des données individuelles. Pour cette raison, certaines analyses de sous-groupes ne peuvent pas être effectuées en raison de données manquantes (données sur le traitement systémique, l'âge, le sexe, l'origine ethnique). En outre, il y avait peu de données sur les échantillons appariés (tumeurs primitives et métastases des mêmes patients) et sur la charge mutationnelle tumorale (« Tumor Mutational Burden » TMB), limitant ainsi la fiabilité des analyses à partir de ces paramètres. La TMB, qui reflète en partie les anomalies génétiques dans une tumeur, a été considéré comme un biomarqueur prédictif de la réponse aux inhibiteurs du point de contrôle [212][203][213]. Cela est particulièrement vrai pour la TMB clonale (c'est-à-dire le nombre estimé de mutations présentes dans chaque cellule cancéreuse), mais probablement pas pour la TMB sous-clonale [186]. De plus, l'analyse d'un seul prélèvement d'une tumeur donnée pourrait surestimer la TMB dans une tumeur, par rapport à un échantillonnage multiple. Dans notre méta-analyse, seules deux études ont évalué la TMB, aucune d'entre elles n'ayant fait d'échantillonnage multiple [92,102]. Certaines prévalences d'altérations géniques doivent être interprétées avec prudence lorsqu'elles ne concernent que quelques études et donc un nombre limité de patients.

Une autre limite de notre méta-analyse est l'hétérogénéité des études lorsque nous avons analysé les tumeurs primitives, malgré diverses analyses de sous-groupes pour remédier à cette limitation. En revanche, pour les échantillons métastatiques, il n'y avait pas d'hétérogénéité entre les études pour les 24 gènes étudiés, à l'exception de *PTEN*, *TET2* et *TSC2*. C'est un résultat majeur de notre méta-analyse, car les clones micro et macro-métastatiques sont ceux que nous devons éradiquer avec des traitements médicaux. Cela souligne la nécessité de biopsie

préférentielle des métastases pour les études génomiques, et non de la tumeur primaire lorsque cela est possible.

## **2. Peut-on identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour les carcinomes à cellules rénales de type cellules claires métastatiques?**

Pour les besoins de ce programme de recherche, nous avons proposé une approche originale.

À l'aide de la technologie OncoScan<sup>TM</sup>, nous avons identifié plusieurs altérations méconnues, en particulier une mutation de *NOTCH1* pL1575P, et nous avons entrepris de caractériser cette mutation à des fins translationnelles.

Ce travail de recherche a été publié dans la revue *Experimental Hematology & Oncology (IF: 10,9 - rank Q1, 42/317 Oncology)* [214].

### **2.1. Matériel et méthodes**

#### **Échantillons métastatiques de patients traités pour l'analyse OncoScan<sup>TM</sup>**

Quatre patients ont été inclus dans la première analyse. Ils avaient tous un ccRCC métastatique, avec une biopsie d'une localisation métastatique effectuée avant tout traitement médical. Les quatre échantillons métastatiques étaient des biopsies fixées en formol.

Conformément à la législation française et la loi de bioéthique (2004-800; 8 juin 2004), tous les patients avaient été informés de l'utilisation de leurs échantillons à des fins de recherche et ne s'y étaient pas opposés. Le consentement a été obtenu pour chaque patient, et ce projet avait été approuvé par un comité d'éthique pour les malades (CPP-Ile-de-France#13218).

#### **Purification de l'ADN et analyse du génome entier sur des échantillons humains**

L'analyse du génome entier a été réalisée sur des cellules tumorales après microdissection laser, à partir des 4 échantillons métastatiques de 4 patients différents et en utilisant la technologie OncoScan-Express® (Affymetrix, États-Unis). OncoScan-Express® utilise un système de génotypage basé sur l'utilisation de sonde inversées (« molecular inverted primers » MIP) dédiées aux tissus fixés en formol/dérivés formolés et dont l'ADN est supposément fragmenté avec des fragments d'environ 100-200 paires de base. Cette technique permet le génotypage de 330000 SNP, détermine les altérations de nombre de copies, les pertes d'hétérozygotie (LOH), et enfin les mutations somatiques dans des hot-spots mutationnels prédéfinis par la technologie.

Les sondes MIP sont des oligonucléotides circularisables, dont les deux extrémités portent deux séquences complémentaires à deux séquences sur le génome, séparées par un seul nucléotide (où se trouve le variant à caractériser). Après hybridation de l'ADN génomique, le produit de la réaction est divisé entre deux tubes, et deux nucléotides sont ajoutés à chaque tube (A/T et C/G). Dans le tube comprenant le nucléotide complémentaire à l'allèle sur le génome, la sonde MIP devient circulaire. Cette structure circulaire est alors sélectionnée, puis de nouveau linéarisée à l'aide d'exonucléases. Les séquences qui ont été sélectionnées sont amplifiées et hybrideées sur une puce Affymetrix pour leur identification. Au moment où nous avons effectué l'analyse, OncoScan™ Assay offrait la possibilité d'identifier 541 mutations somatiques hot-spots, avec une couverture de plus de 200 gènes suppresseurs de tumeurs et oncogènes. La technologie permet de couvrir le génome avec un espacement médian de 1 sonde par 0,5 kb pour les 10 principaux gènes suppresseurs de tumeurs « actionnables », un espacement médian de 1 sonde par 2 kb pour les plus de 190 oncogènes actionnables, et un espacement médian de 1 sonde par 9 kB pour le reste du génome.

L'analyse des données brute a été effectuée sur le logiciel Nexus-7 (BioDiscovery, États-Unis).

#### **ddPCR and validation of the NOTCH1 mutation in metastatic samples**

La technique de PCR digitale (ddPCR pour “digital-droplet PCR”) a été réalisée à l'aide de la technologie ddPCR QX100 (Biorad, Hercules, CA, États-Unis). Le mélange contenait 20 ng d'ADN génomique, 10 µL de ddPCR Supermix pour sondes (No dUTP) (Bio Rad), 1 µL de sondes *NOTCH1* de type sauvage ou spécifique de la mutation pL1575P *NOTCH1* (12772, Qiagen, Allemagne) (Annexe 1) et 1 µL de sonde RNaseP (Taqman® copy number Reference Assay, 4403326, Life Technologies) par puits, le volume final de la réaction étant de 20 µL. Les gouttelettes ont été générées par un générateur de gouttelettes QX200 (Biorad). La PCR a été réalisée sur le système CFX96 Real Time (Bio Rad). Les résultats de la ddPCR ont été générés à l'aide du lecteur de gouttelettes QX100 (Biorad) et analysés à l'aide du logiciel QuantaSoft (Biorad). Le rapport entre les gouttelettes *NOTCH1* positives et les gouttelettes RnaseP-positives a été calculé.

Nous avons calculé la fréquence des allèles mutants en utilisant la formule mathématique  $M_{mu}/MDNA_{conc}$ ,  $M_{mu}$  étant le nombre de copies mutantes par gouttelette et  $MDNA_{conc}$  étant la concentration d'ADN dans la réaction.  $M_{mu}$  et  $MDNA_{conc}$  sont calculés comme suit :

$M_{mu} = -\ln(1-(n_{mu}/n))$ , où  $n_{mu}$  = nombre de gouttelettes positives pour la sonde *NOTCH1* mutante et  $n$  = nombre total de gouttelettes.  $MDNA_{conc} = -\ln(1-(nDNA_{con}/n))$ , où  $nDNA_{con}$

= nombre de gouttelettes positives pour la sonde NOTCH1 de type sauvage et /ou la sonde *NOTCH1* mutante et n = nombre total de gouttelettes [205][215].

Un ADN obtenu à partir d'un patient atteint de leucémie aiguë lymphoblastique T et porteur de la mutation pL1575P *NOTCH1* a été fourni par P.V et utilisé comme témoin positif.

### **Détection de cellules cancéreuses exprimant NOTCH1-ICD dans les métastases et les xénogreffes tumorales**

#### *Marquage immunohistochimique*

Une méthode d'immunomarquage indirecte en peroxydase a été réalisée sur des coupes de tissus de 5 µm d'épaisseur en utilisant l'anticorps anti-NOTCH1-ICD (ab8925, 1:200, Abcam) comme anticorps primaire pour détecter le fragment clivé de NOTCH1. En effet, cet anticorps a été sélectionné pour reconnaître spécifiquement le fragment clivé intra-cytoplasmique ou nucléaire de NOTCH1.

Les contrôles systématiques utilisés étaient l'absence d'anticorps primaire et l'utilisation d'un anticorps primaire non pertinent du même isotype.

#### *Immunomarquage en fluorescence*

Pour détecter NOTCH1-ICD dans les cellules endothéliales, un double marquage en immunofluorescence indirecte a été réalisé en utilisant des anticorps anti-NOTCH1-ICD et anti-CD31 comme anticorps primaires. Le marquage fluorescent des anticorps primaires a été réalisé en les couplant avec une Tyramide 488CF pour l'anti-NOTCH1 et une Tyramide 543F pour l'anti-CD31. La fluorescence a ensuite été détectée avec le kit de détection Tyramide 488CF (biotium, 99824) et 543CF (biotium, 99825) respectivement. Un marquage fluorescent au DAPI a été utilisé pour la détection du noyau (E19-18, laboratoires GBI).

#### *Analyse en Western blot*

L'extraction des protéines a été réalisée à partir de tissus cryoconservés à l'aide d'un tampon RIPA (Thermo) complété d'un cocktail d'inhibiteurs de protéase sans EDTA (Roche Diagnostics) et d'inhibiteurs de phosphatase (Sigma-Aldrich).

La migration des protéines était faites sur des gels préfabriqués Mini-PROTEAN TGX à 10 % (Biorad), puis le produit de migration transféré sur une membrane de nitrocellulose de 0,2 µm (Biorad) à l'aide du système Trans-Blot Turbo Transfer. L'immunocoloration a été réalisée en utilisant des anticorps anti-NOTCH1-ICD (ab8925, 1 :500, Abcam) et anti-GAPDH (ab9485, 1 :2500, Abcam), la GAPDH étant choisie comme protéine de référence/normalisation. Un HRP

anti-lapin (ab32568, 1 :1000, Abcam) a été utilisé comme anticorps secondaire. La révélation a été faite à l'aide du substrat ECL Clarity Western (Biorad) et la lecture sur le système de détection ChemiDoc XRS+ (Biorad). Les analyses ont été effectuées avec Image Lab Software 6.1 (Biorad).

#### *Microdissection laser de cellules exprimant NOTCH1-ICD*

Pour confirmer que l'expression de NOCTH1-ICD dans les cellules cancéreuses ou les cellules endothéliales tumorales était associée à la présence de la mutation pL1575P de *NOTCH1*, nous avons combiné la micro-dissection laser de cellules exprimant NOTCH1-ICD avec la ddPCR pour la détection de la mutation *pL1575P* de *NOTCH1* en discrimination allélique.

Pour chaque échantillon analysé, des coupes de tissu de 7 µm d'épaisseur ont été micro-disséquées avec le microdissecteur laser pour sélectionner un minimum de 300 cellules cancéreuses ou 100 cellules endothéliales tumorales exprimant NOCTH1-ICD, à l'aide d'un système PALM-Microbeam/Zeiss (Carl Zeiss, Allemagne). L'ADN total a été extrait des cellules micro-disséquées à l'aide de DNeasy-Micro-Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), et concentré dans un volume final de 10 µL.

Pour les analyses du nombre de copies du gène *NOTCH1*, l'ADN total extrait de cellules tumorales micro-disséquées a été traité par ddPCR comme décrit ci-dessus.

#### **Xénogreffes de carcinome à cellules claires à cellules claires dérivées du patient et traitement**

Cinq modèles de xénogreffes de ccRCCs dérivés de patients ont été obtenus à partir de biopsies de métastases [216] (Annexe 2). Le Comité national d'éthique pour les études sur les animaux a approuvé cette étude (APAFIS # 17190-2018101814245111). Les différentes recommandations éthiques sur l'expérimentation animale ont été suivies et répondaient à la fois aux normes européennes et aux normes américaines [217]. Les animaux ont été élevés dans l'animalerie de l'Université Sorbonne Paris Nord (numéro d'agrément : C9300801).

Après une greffe réussie, la croissance tumorale est mesurée dans deux diamètres perpendiculaires avec un pied à coulisse. Les volumes tumoraux sont calculés comme suit :  $V = L \times l_2 \div 2$ , L étant le plus grand diamètre (longueur), l le plus petit (largeur). Lorsque les tumeurs atteignent un volume de 400 mm<sup>3</sup> (n = 6 souris par groupe de traitement), les souris sont séparées en quatre groupes : i) traitement par gavage avec du sunitinib à 40 mg / kg / jour (groupe 1), ii) traitement par gavage avec un inhibiteur de NOTCH1 (CB-103, HY-135145, MedChem Express à 25 mg / kg / deux fois par jour ou (LY411575, S2714, Selleckchem) à 10 mg / kg / jour (groupe

2)) ; iii) traitement combiné par gavage avec le sunitinib, à raison de 40 mg/kg/jour, et avec l'inhibiteur de NOTCH1 (CB-103 ou LY411575) (groupe 3) ; iv) traitement avec 100 µL de NaCl à 0,9% comme témoin (groupe 4). Tous les traitements ont été administrés pendant 30 jours. Un score clinique quotidien a été enregistré et la croissance tumorale a été mesurée chaque semaine jusqu'à ce que le poids tumoral atteigne la limite éthiquement recommandée de moins de 10 % du poids corporel de la souris (directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques ; Journal officiel de l'Union européenne L 276/33).

Un coefficient de croissance d'inhibition a été calculé pour chaque bras de traitement (Figure 11), en utilisant un rapport des pentes ( $a$  et  $a'$ ) des lignes droites avant et après le traitement. Dans tous les modèles de xénogreffes, le coefficient d'inhibition d'un médicament a été calculé comme  $(a'-a)/a$ , étant la pente de la courbe avant le début du traitement (jour 0) - et  $a'$  la pente de la courbe entre le jour 0 et le jour 30 du traitement. Pour une combinaison de médicaments donnée, si le coefficient d'inhibition était négatif, la tumeur était considérée comme sensible au médicament. Si, en revanche, il était positif, la tumeur était considérée comme résistante à ce médicament.

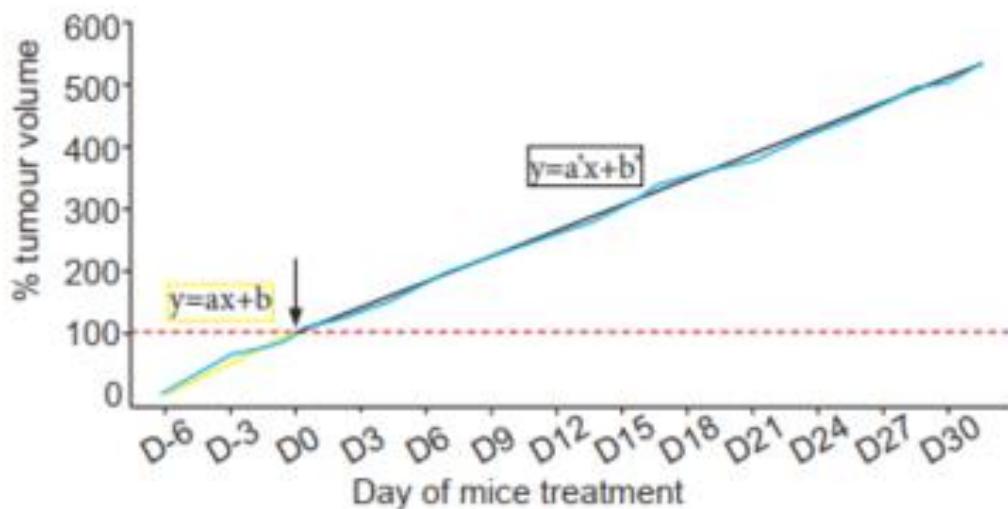


Figure 11. Coefficient d'inhibition de la croissance tumorale dans les modèles XRCC

Pour un médicament ou une combinaison de médicaments, le coefficient d'inhibition est calculé comme suit :  $(a'-a)/a$ ,  $a$  étant la pente de la courbe avant le début du traitement (jour 0), et  $a'$  la pente de la courbe entre le jour 0 et le jour 30 du traitement. Si ce coefficient d'inhibition de la croissance est inférieur à 0, la tumeur est considérée comme sensible au médicament administré ; Si elle est supérieure à 0, la tumeur est considérée comme résistante au médicament.

## **Évaluation *in situ* de la nécrose, de la prolifération cellulaire, de l'angiogenèse et de l'apoptose**

Lorsqu'elle était présente, la nécrose était délimitée sur des lames virtuelles créées avec un scanner Nanozoomer2.0H (Hamamatsu / Japon) et quantifiée à l'aide du logiciel DotSlide2. Les résultats ont été exprimés comme la somme des zones nécrotiques pour chaque section, et la moyenne ± SEM.

Pour la densité microvasculaire, la prolifération et le compte apoptotique, une méthode d'immunomarquage indirecte en peroxydase a été réalisée sur des coupes de tissus de 5 µm d'épaisseur, en utilisant l'anticorps monoclonal de souris anti-Ki67 humain (M724001-2, 1 :100, Agilent) comme anticorps primaire pour la prolifération, l'anticorps polyclonal de lapin anti-caspase-3 clivée humaine (Asp175, 1 :200, Cell signalling Technology) comme anticorps primaire pour l'apoptose, et l'anticorps polyclonal de lapin anti-rat CD31 (SZ31, 1 :30, Dianova) comme anticorps primaire pour la densité microvasculaire. Pour le CD31, l'anticorps secondaire était de lapin anti-rat IgG H&L (ab6703, 1 :200, Abcam). Pour le Ki67, l'anticorps secondaire était de lapin anti-souris IgG H&L (clone M1gG51-4, 1 :200, Abcam). L'anticorps secondaire a été couplé à un kit de détection anti-lapin OmniMap (Roche diagnostic, Meylan, France).

Pour chaque section tumorale analysée, la prolifération et le compte des cellules apoptotiques ont été effectués sur cinq champs différents à un grossissement x400, à l'aide d'un microscope ProvisAX70 (Olympus, Tokyo) avec un oculaire à grand champ numéro 26,5 fournissant une taille de champ de 0,344 mm<sup>2</sup> à un grossissement X400. Les images du microscope ont été capturées à l'aide d'un appareil photo numérique ColorView-III et analysées à l'aide du logiciel Olympus-SIS Cell F. Le pourcentage de cellules positives dans 100 cellules cancéreuses a été déterminé et les résultats ont été exprimés en moyennes ± SEM. Pour la densité microvasculaire, les micro-vaisseaux CD31-positifs ont été comptés sur dix champs différents, à un grossissement X400. Le nombre de micro-vaisseaux positifs était rapporté au nombre total de micro-vaisseaux dans une surface donnée étudiée. Les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes ± écart-type.

### **Analyse statistique**

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel statistique R Studio 1.3.1073.

Pour l'analyse de la variation du nombre de copies dérivée du résultat de la technologie Oncoscan™ et de nos données de méta-analyse, nous avons utilisé le package *copynumber* dans R.

Pour le nombre de cellules tumorales exprimant NOTCH1, la moyenne  $\pm$  SEM a été calculée pour chaque échantillon tumoral (RCC primitif, métastase ou xénogreffe tumorale) et représentée sous forme d'histogrammes.

Les valeurs quantitatives ont été comparées à l'aide du test t de Student (bilatéral), tandis que les proportions ont été comparées à l'aide du test Z. Les valeurs de P inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives.

## 2.2. Résultats

### Signature du génome entier des quatre métastases de ccRCC à l'aide de la technologie OncoScan®

Quatre patients ont été inclus dans la première analyse (Tableau 9).

*Tableau 9. Caractéristiques des quatre patients inclus dans l'étude initiale utilisant la technologie Oncoscan™*

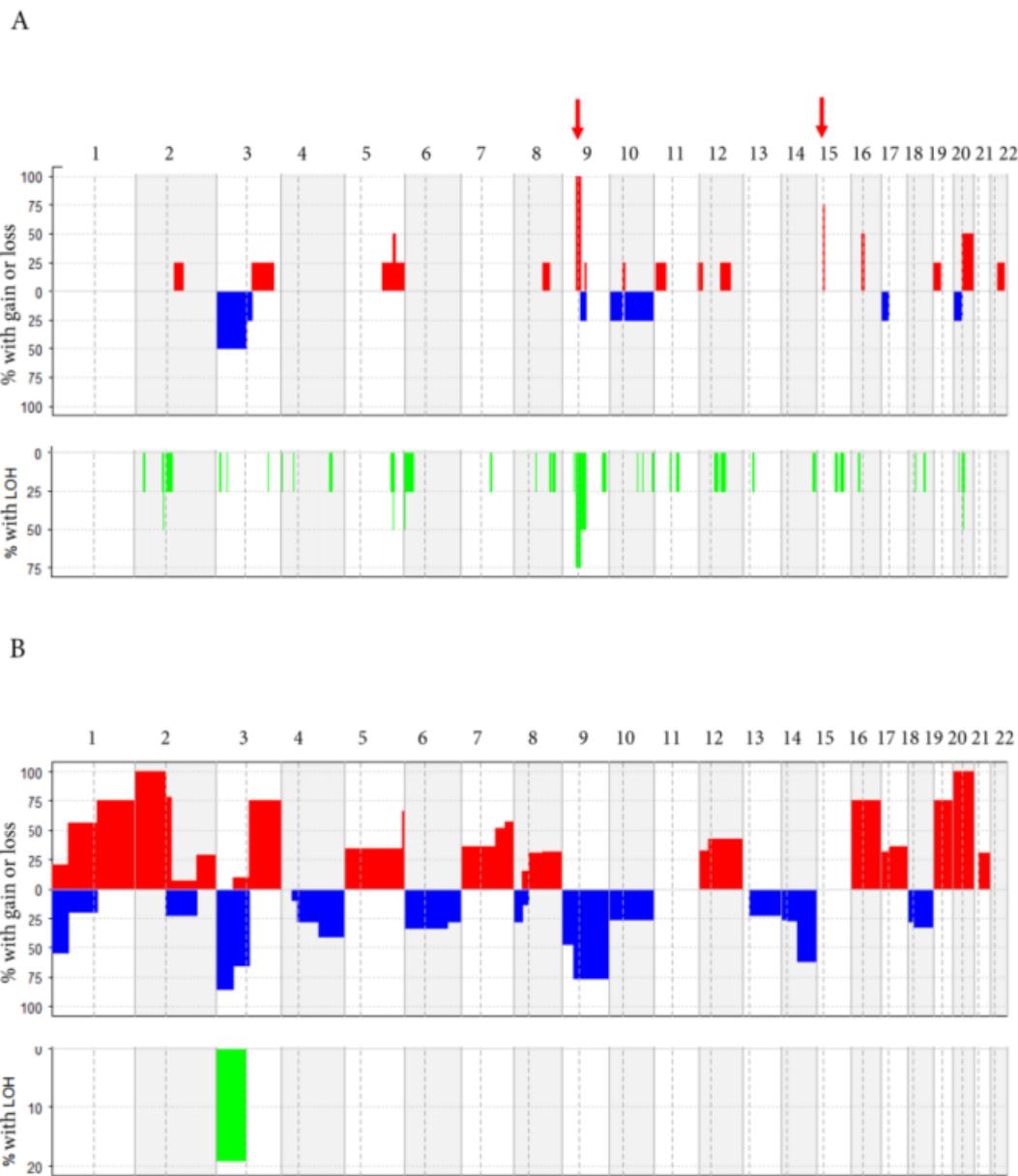
	Âge à l'échantillonnage chirurgical	Type histologique	Grade ISUP	Groupe à risque*	Localisations métastatiques	Site d'échantillonnage chirurgical
Patient 1	57	ccRCC	3	Intermédiaire	Cerveau, poumon, Ganglions lymphatiques	Poumon
Patient 2	80	ccRCC	3	Bien	Poumon	Poumon
Patient 3	60	ccRCC	3	Intermédiaire	Poumon	Poumon
Patient 4	54	ccRCC	3	Bien	Surrénales Cerveau	Surrénale

\* Selon la classification MSKCC [218]

À l'aide de la technologie OncoScan™, nous avons identifié un panel d'altérations du nombre de copies et de pertes d'hétérozygotie (LOH) (Figure 12A). Nous avons comparé ces résultats aux données obtenues à partir de notre méta-analyse sur les données génomiques des ccRCCs (Figure 12B) [71] et avons trouvé des événements communs connus pour survenir tôt dans la cancérogenèse des ccRCCs, notamment la perte totale du 3p et l'amplification du 5q.

En revanche, certaines anomalies n'avaient jamais été décrites. C'est le cas de l'amplification du locus 9q11.2 qui a pourtant été identifiée dans les 4 échantillons, ou encore l'amplification du locus 15q11.1-11.2 retrouvée pour 3 des 4 métastases. En outre, l'amplification du 9q11.2 est associée à une LOH dans le même locus, suggérant son rôle potentiel dans le processus

métastatique du ccRCC. Au niveau de ces deux loci, très peu de gènes ont été étudiés pour leur rôle potentiel dans la cancérogenèse du ccRCC (Annexe 3). On peut néanmoins citer MIR1299 qui coderait pour un circARN, circ-EGLN3, impliqué in vitro dans la prolifération de cellules de ccRCC par la régulation de l'expression de IRF7 [219].



*Figure 12. Gains et pertes de nombre de copies dans 4 échantillons de ccRCC métastatiques à l'aide d'Oncoscan™*

(A). Comparaison avec les 433 échantillons de ccRCC métastatiques de notre méta-analyse sur les données génomiques de ccRCCs (B). Certaines des anomalies n'ont pas été décrites précédemment, y compris les amplifications 9q11.2 et 15q11.1-11.2 (flèches rouges sur le panneau A)

Nous avons également identifié des mutations « hot-spots » potentielles dans les 4 métastases analysées (Annexe 4). Nous avons considéré un seuil de 9 pour le score de probabilité afin de

filtrer les données, tel que recommandé par la technologie. Nous avons ainsi identifié 48 mutations potentielles (Tableau 10). Typiquement, et servant de contrôle de qualité, nous avons identifié des mutations du gène *VHL* pour 3 des 4 patients. Les trois autres gènes les plus fréquemment mutés dans les ccRCCs, à savoir *PBRM1*, *SETD2* et *BAP1*, n'étaient pas inclus dans ce panel OncoScan™.

*Tableau 10. Mutations ponctuelles identifiées dans les métastases de 4 ccRCCs avant le traitement*

	<b>Patient 1</b>	<b>Patient 2</b>	<b>Patient 3</b>	<b>Patient 4</b>
ABL1_pF359V_c1075T_G	12	12	16	12
NPM1_pW288fs12_c863_864insCATG_allele1	13	9	9	11
<b>NOTCH1_pL1575P_c4724T_C</b>	<b>11</b>	<b>21</b>	<b>0</b>	<b>9</b>
MEN1_p_c654_plus_3A_G	3	20	10	11
VHL_pE160K_c478G_A	11	1	9	10
RET_pM918T_c2753T_C	28	0	1	1
PTEN_pI101T_c302T_C	17	5	14	11
PTEN_pE235X_c703G_T	14	12	6	5
PTEN_pR173C_c517C_T	19	-1	7	3
PIK3CA_pC420R_c1258T_C	16	-1	-1	-1
PIK3CA_pC901F_c2702G_T	15	6	4	6
PIK3CA_pH701P_c2102A_C	14	-1	1	-1
PIK3CA_pY1021C_c3062A_G	10	5	8	8
PDGFRA_pD1071N_c3211G_A	11	1	12	8
NF1_pR816X_c2446C_T	19	10	10	5
NF1_pK1444E_c4330A_G	19	-1	7	5
NF1_pR1276X_c3826C_T	16	1	8	4
NF1_pR461X_c1381C_T	12	5	12	5

NF2_pQ362X_c1084C_T	16	1	10	4
RB1_p_c2107_minus_2A_G	11	-1	13	9
RB1_pQ702X_c2104C_T	13	6	12	11
RB1_pR787X_c2359C_T	14	13	8	-1
RB1_p_c1961_minus_1G_A	8	9	12	8
RB1_pR251X_c751C_T	7	6	12	0
CDKN2A_p_c151_min_1G_A	7	11	7	5
BRCA1_pG1077W_c3229G_T	13	-1	1	14
BRCA2_pR2678S_c8034G_T	10	15	11	-1
BRCA2_pS1682S_c5046T_C	10	3	13	11
APC_pQ1367X_c4099C_T	15	0	14	10
APC_pR213X_c637C_T	15	-1	0	7
APC_pQ789X_c2365C_T	13	-1	3	-1
APC_pE853X_c2557G_T	4	5	12	4
NPM1_pW288fs12_c863_864insTCTG_allele1	19	4	6	4
NPM1_pW288fs12_c863_864insCCTG_allele1	11	4	7	6
ERBB2_pG776S_c2326G_A	12	6	5	10
TP53_pE336X_c1006G_T	10	11	8	6
TP53_pC135F_c404G_T	-1	11	0	-1
KRAS_pQ61K_c181C_A	9	14	0	8
NRAS_pQ61H_c183A_C	12	6	3	-1
PAK7_pT397K_c1190C_A	19	12	4	6
SMAD4_pD537Y_c1609G_T	16	11	6	4
RUNX1_pR166X_c496C_T	15	8	4	8

MLH1_pC233R_c697T_C	11	-1	-1	4
IRAK1_pS690G_c2068A_G	14	-1	-1	11
TSHR_pM453T_c1358T_C	13	8	6	1
CBL_pR420Q_c1259G_A	11	7	11	5
MSH2_pR711X_c2131C_T	3	11	9	-1
INPP4A_pE940D_c2820A_C	11	-1	2	8

En revanche, plusieurs mutations n'avaient jamais été décrites dans le ccRCC.

Nous avons choisi de nous intéresser à la mutation *NOTCH1 pL1575P\_c4724T\_C*, située en 9q34.3, parce qu'elle était retrouvée dans 3 des 4 métastases analysées avec un score de probabilité élevé de 21 pour le patient 2. En outre, la voie NOTCH est décrite comme souvent impliquée dans le ccRCC, pouvant donc être une cible thérapeutique potentielle [209-213]. Enfin, dans notre méta-analyse, le bras 9q est perdu dans 75% des ccRCC (Figure 12A), et nous avons trouvé un déséquilibre allélique du 9q34.3 pour le patient 1 et le patient 2 (Annexe 4).

#### **La mutation pL1575P\_c4724T\_C de NOTCH1 est un événement moléculaire fréquent dans les métastases de ccRCC**

En utilisant le séquençage Sanger, nous n'avons pas été en mesure de confirmer la présence de la mutation pL1575P\_c4724T\_C de *NOTCH1* dans aucun des 3 échantillons métastatiques, ni dans le contrôle positif de la leucémie aiguë lymphoblastique T (LAL-T).

En revanche, en utilisant la ddPCR en discrimination allélique, à savoir avec une sonde spécifique de la mutation pL1575P\_c4724T\_C, nous avons confirmé qu'elle était présente dans l'échantillon tumoral « témoin positif » de LAL-T, et de fait dans les 3 échantillons métastatiques des patients 1, 2 et 4 (Figure 13A), mais pas dans l'échantillon du patient 3, en accord avec les données Oncoscan.

Le nombre absolu de copies de *NOTCH1* muté était de 1516, 1221 et 1346 pour les patients 1, 2 et 4, respectivement, correspondant à une fréquence de l'allèle mutant de 61%, 65% et 59% respectivement. Ce résultat témoigne a priori d'une hétérogénéité intra-tumorale spatiale, tout au moins pour les patients 1 et 2 qui ont en théorie une perte du 9q34.3 et donc du second allèle (Figure 13A).

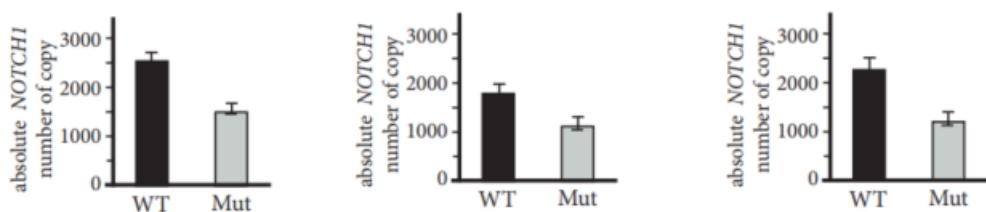
A

## ddPCR allelic discrimination for pL1575P\_c4724T\_C NOTCH1 mutation

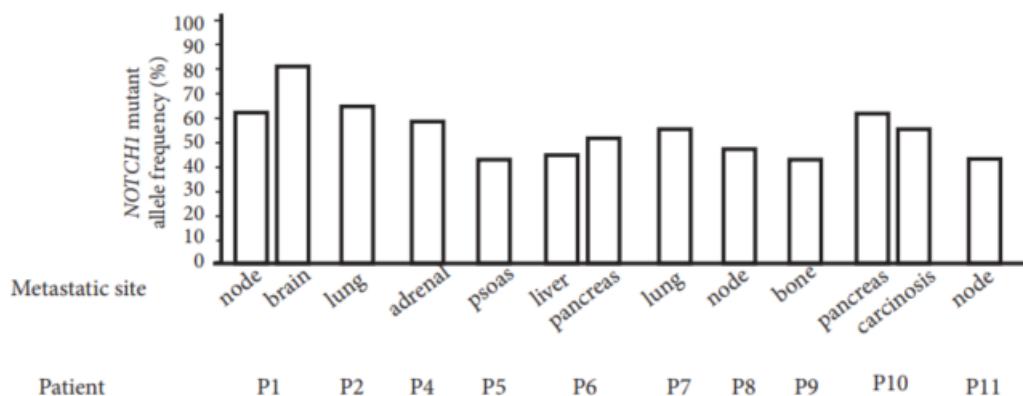
Patient 1

Patient 2

Patient 4



B



*Figure 13. Discrimination allélique en ddPCR pour la mutation NOTCH1 pL1575P\_c4724T\_C, dans 3 des 4 échantillons métastatiques traités par analyse Oncoscan™ (A), et dans dix échantillons métastatiques supplémentaires (B).*

Nous avons alors testé 9 échantillons de biopsies métastatiques de 7 patients supplémentaires avec des ccRCC métastatiques. Nous avons retrouvé la présence de la mutation pL1575P de NOTCH1 dans tous les échantillons, avec une fréquence allélique moyenne de 53,5% et allant de 43% à 80,5% (Figure 13B).

### La mutation pL1575P de NOTCH1 est une mutation activatrice

NOTCH1 est un récepteur transmembranaire qui appartient à la voie de signalisation NOTCH, voie canonique de l’organogénèse, hautement conservée au cours de l’évolution.

La plupart des mutations de NOTCH1 se produisent dans les domaines HD et/ou PEST [225] (Figure 14A). La mutation pL1575P de NOTCH1 est située dans le domaine HD-N et est responsable de l’activation constitutive de NOTCH1 dans les LAL-T [215]. Dans les cellules de LAL-T, la mutation est responsable de l’exposition du domaine de clivage enzymatique S2, permettant le clivage du récepteur NOTCH1 avec la génération constante d’une forme tronquée de NOTCH1. Le clivage en S3, médié par un complexe protéase  $\gamma$ -sécrétase, libère le domaine intracellulaire actif de NOTCH1 (NOTCH1-ICD) dans le cytoplasme. Après translocation dans le noyau, NOTCH1-ICD se lie à des co-facteurs comme MAML pour former un complexe

transcriptionnel favorisant la transcription de gènes impliqués dans la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire (Figure 14B).

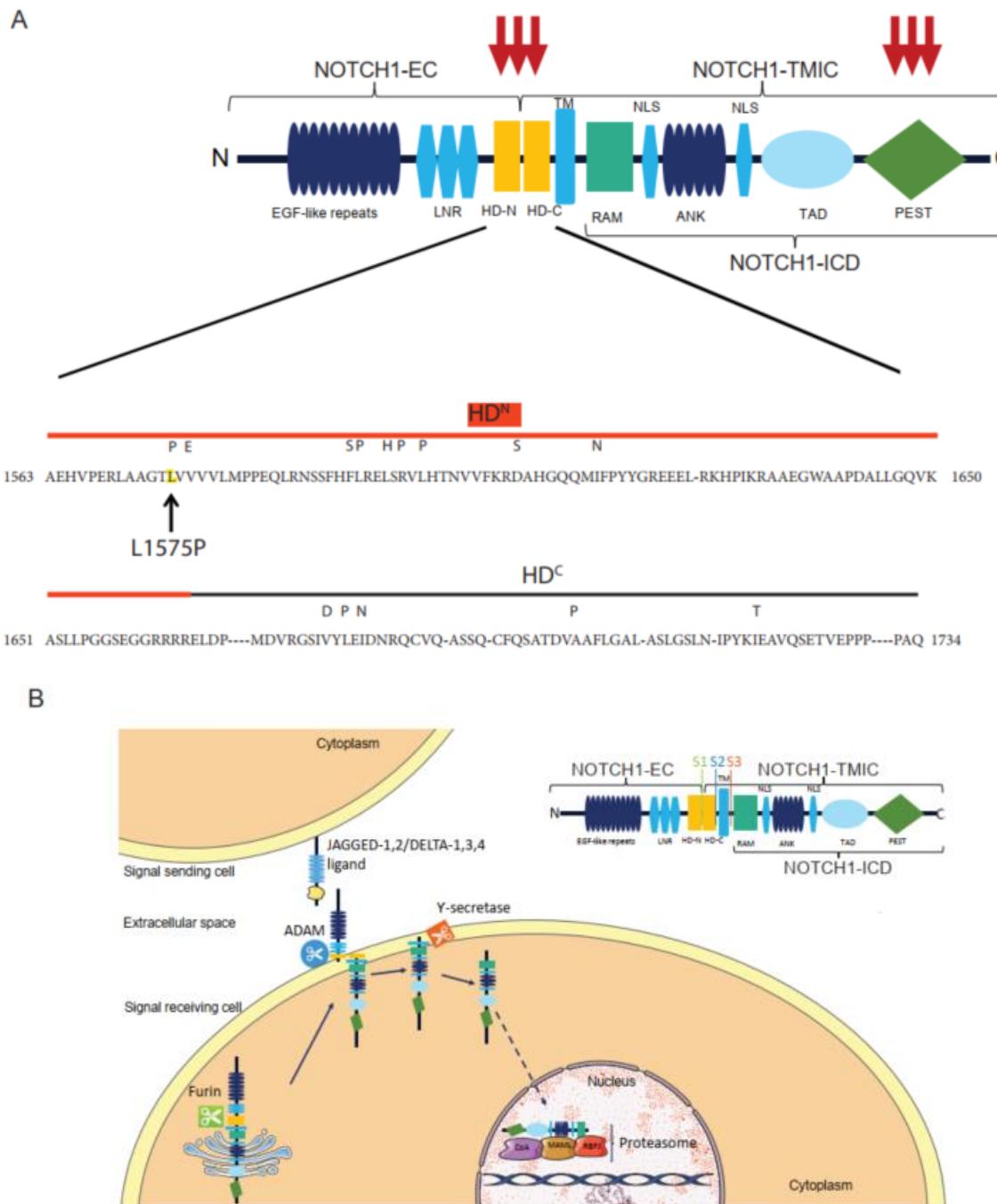


Figure 14. Structure de la protéine NOTCH1 et voie de signalisation.

(A) structure protéique NOTCH1, le récepteur NOTCH1 mature est un hétérodimère composé d'une sous-unité extracellulaire (NOTCH1-EC) et d'une sous-unité transmembranaire et intracellulaire (NOTCH1-TMIC). NOTCH1-EC comprend des répétitions de type facteur de croissance épidermique (EGF), impliquées dans la liaison au ligand, trois répétitions LIN-12/NOTCH (LNR), qui empêchent l'activation du récepteur en l'absence de ligands, et le domaine d'hétérodimérisation (HD) impliqué dans les interactions non covalentes entre NOTCH1-EC et NOTCH1-TMIC. NOTCH1-TMIC comprend le domaine transmembranaire (TM) et le domaine intracellulaire (CIM) (NOTCH1-ICD). NOTCH1-ICD comprend un domaine moléculaire associé à RBPJ (RAM), sept répétitions d'ankyrine (ANK) se liant à

*MAML*, des signaux de localisation nucléaire (NLS), un domaine de transactivation (TAD) et un domaine PEST, à leur tour impliqués dans la dégradation protéasomale de NOTCH1-ICD actif. La plupart des mutations de NOTCH1 sont situées dans les domaines HD et PEST (flèches rouges), et la mutation NOTCH1 pL1575P\_c4724T\_C (surlignée en jaune) est située dans le domaine HDN.

(B) Le précurseur NOTCH1 nouvellement synthétisé est clivé par une convertase de type furine (furine) dans l'appareil de Golgi pour générer le récepteur mature. La signalisation NOTCH1 se produit lorsqu'un ligand « JAGGED » ou « DELTA » exprimé par une cellule émettrice interagit avec NOTCH1 présent sur une cellule réceptrice du signal. Cette interaction déclenche deux clivages séquentiels de NOTCH1 : le premier, par le biais d'une métalloprotéinase (ADAM), génère le substrat pour le second clivage par la  $\gamma$ -sécrétase, qui libère le fragment NOTCH1-ICD actif. NOTCH1-ICD se transloque vers le noyau où il forme un complexe d'activation transcriptionnelle en interagissant avec le facteur de transcription CSL / RBP-Jk et d'autres coactivateurs (CoA) comme MAML, conduisant à l'expression des gènes cibles de NOTCH1. Dans des conditions physiologiques, l'expression de NOTCH1 est régulée par l'ubiquitination et la dégradation protéasomale de NOTCH1-ICD.

Pour identifier la forme protéique de NOTCH1-ICD, nous avons effectué une coloration immunohistochimique à l'aide d'un anticorps anti-NOTCH1 (aa 1755-1767-intracellulaire) qui reconnaît spécifiquement un épitope du fragment ICD lui-même uniquement exposé après clivage par la  $\gamma$ -sécrétase. Nous avons objectivé la présence d'un marquage nucléaire et cytoplasmique, bien que prédominant dans le noyau des cellules, dans les 3 échantillons métastatiques des patients 1, 2 et 4 (Figure 15A). Nous avons également constaté que toutes les cellules cancéreuses n'étaient pas marquées, confirmant l'hétérogénéité suggérée par la fréquence allélique de la mutation. Lorsque nous avons isolé les cellules cancéreuses exprimant NOTCH1-ICD de celles qui ne l'exprimaient pas, en utilisant la technique de microdissection laser, la mutation pL1575P NOTCH1 était principalement présente dans les cellules cancéreuses exprimant NOTCH1-ICD (57% vs 17%,  $P < 0,01$ , Figure 14B).

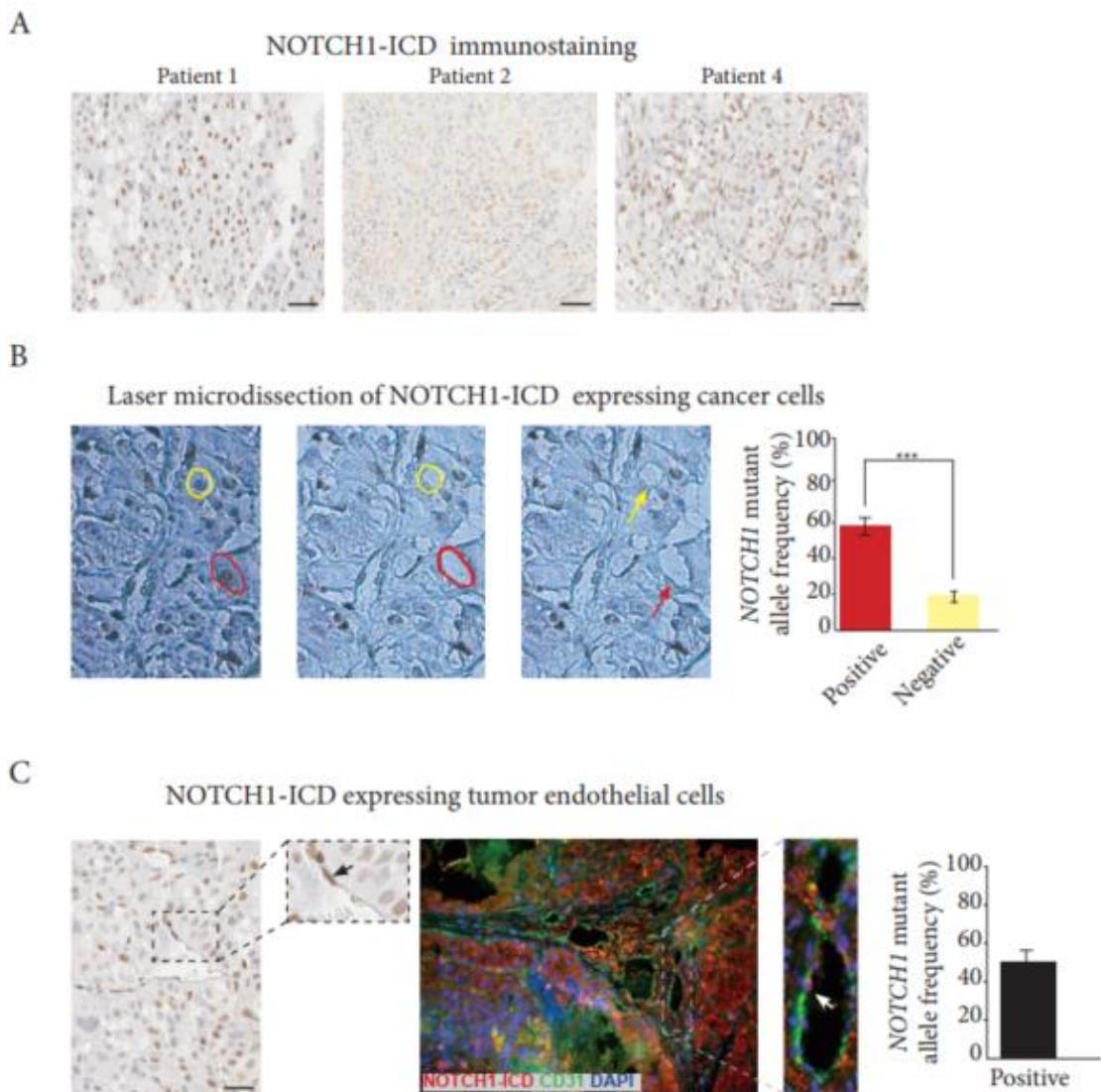


Figure 15. Cellules cancéreuses et cellules endothéliales tumorales exprimant NOTCH1-ICD dans des échantillons humains.

(A) La coloration NOTCH1-ICD est principalement nucléaire dans les 3 échantillons métastatiques des patients 1, 2 et 4.

(B) Le pannel B illustre la microdissection laser d'une cellule cancéreuse exprimant NOTCH1-ICD (cercle rouge et flèche) et d'une cellule cancéreuse n'exprimant pas NOTCH1-ICD (cercle jaune et flèche), avec une différence significative en termes de pourcentage de fréquence des allèles mutants NOTCH1. \*\*\*  $P < 0,001$ .

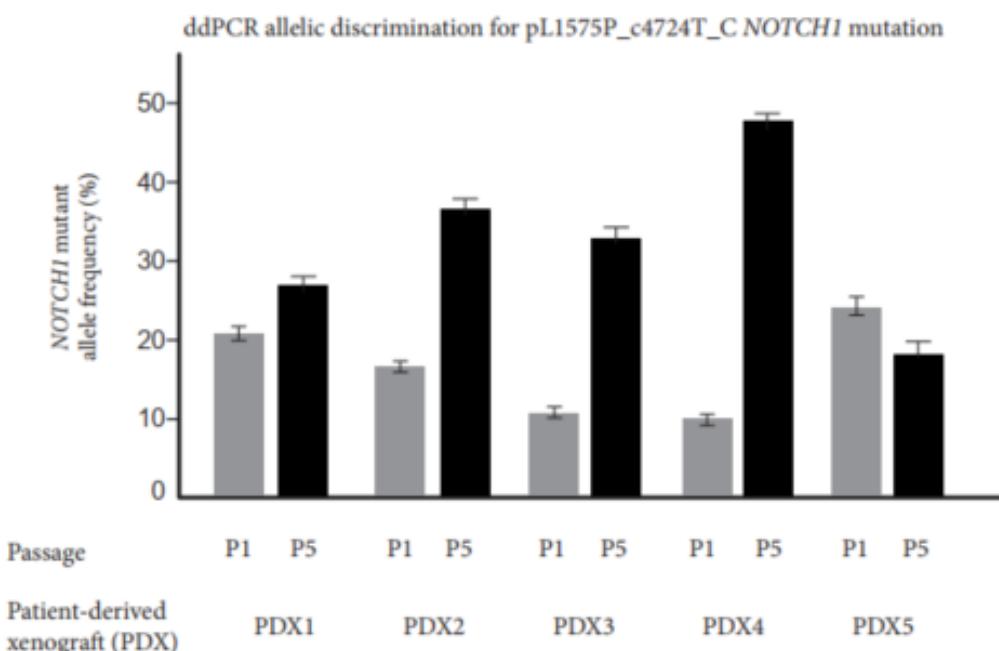
(C) Le pannel de gauche montre la coloration NOTCH1-ICD d'une cellule endothéliale tumorale (flèche noire). Certaines cellules endothéliales tumorales peuvent être vues pour co-exprimer NOTCH1-ICD (rouge) et anti-CD31 (vert) sur le marquage en immunofluorescence (pannel du milieu). Le pannel de droite montre que les cellules endothéliales tumorales microdisséquées exprimant NOTCH1-ICD portent la mutation pL1575P NOTCH1 avec une fréquence allélique de 48%.

Étonnamment, nous avons constaté que les cellules endothéliales tumorales exprimaient également NOTCH1-ICD pour certaines d'entre elles (Figure 15C). Pour confirmer cette observation, en utilisant un double immunomarquage par fluorescence, nous avons montré que

certaines cellules exprimant CD31, mais pas toutes, co-exprimaient NOTCH1-ICD (Figure 14C). En utilisant la micro-dissection laser, nous avons sélectionné les cellules endothéliales tumorales exprimant NOTCH1-ICD et retrouvé la présence de la mutation pL1575P *NOTCH1* avec une fréquence allélique de 48%, comparable à celle trouvée dans les cellules cancéreuses (Figure 15C).

### **La mutation *NOTCH1* pL1575P est fréquemment retrouvée dans les xénogreffes de ccRCC obtenues à partir d'échantillons métastatiques humains**

Cinq modèles de xénogreffes de tumeurs de patients obtenues à partir de métastases de ccRCCs ont été utilisées dans ce projet, et avaient été mis en place et caractérisés avant mon travail de Thèse (XRCC1 à XRCC5). En utilisant la même technique de discrimination allélique en ddPCR pour la mutation pL1575P\_c4724T\_C de *NOTCH1*, nous avons identifié la mutation dans les cinq modèles de xénogreffes de ccRCC au passage 1 (P1), avec des fréquences alléliques allant de 10,1 à 48,8%. À l'exception du modèle XRCC5, la fréquence allélique de la mutation pL1575P\_c4724T\_C de *NOTCH1* a significativement augmenté entre P1 et P5 dans les quatre autres modèles (Figure 16).

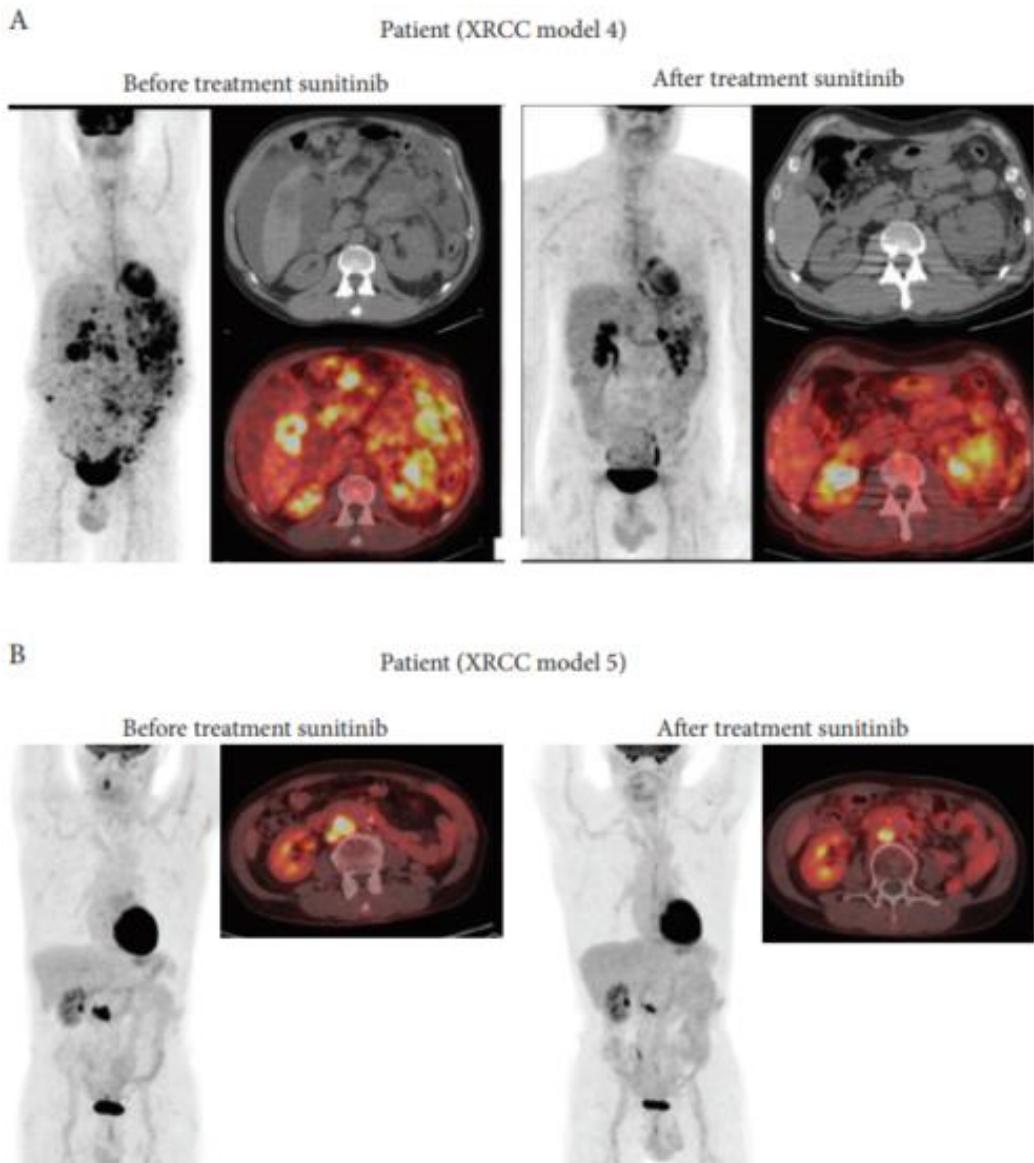


*Figure 16. Discrimination allélique ddPCR pour la mutation NOTCH1 pL1575P\_c4724T\_C dans 5 xénogreffes tumorales XRCC au premier (en gris) et au cinquième (en noir) passages.*

### **Le ciblage spécifique de NOTCH1-ICD inhibe la croissance tumorale *in vivo***

Pour les expériences *in vivo* utilisant des inhibiteurs de NOTCH1, nous avons choisi les modèles XRCC4 et XRCC5 en raison de l'enrichissement marqué de la mutation *NOTCH1* dans la

xénogreffe XRCC4 (fréquence de mutation allélique de 48% à P5) et par contre une fréquence d'allélique beaucoup plus faible pour la xénogreffe XRCC5 (19% à P5). Ces deux modèles ont été obtenus à partir d'échantillons métastatiques de deux patients répondant au traitement par sunitinib (Figure 17), ce qui est un facteur prédictif de la réponse au sunitinib pour les deux modèles [216].



*Figure 17. Réponse au traitement par sunitinib pour les deux patients ayant fourni des échantillons métastatiques pour les modèles de xénogreffes.*

(A) Patient correspondant au modèle XRCC4. (B) Patient correspondant au modèle XRCC5.

Nous avons traité ces deux modèles avec deux inhibiteurs différents de NOTCH1, CB-103 et LY411575. Après une recherche dans la littérature, j'ai choisi ces deux inhibiteurs parmi un panel de 10 inhibiteurs de NOTCH1 en raison de leurs mécanismes biologiques.

Tout d'abord, j'ai exclu les inhibiteurs du ligand DLL4 ainsi que l'anticorps anti-NOTCH1 brontictuzumab, en raison du mécanisme d'activation de la voie NOTCH1 en lien avec notre mutation. Je n'ai gardé que les inhibiteurs en aval du clivage S2, à savoir les inhibiteurs de  $\gamma$ -sécrétase, et le CB-103.

LY411575 est un inhibiteur de  $\gamma$ -sécrétase avec une IC<sub>50</sub> de 0,39 nM, donc possiblement le plus « puissant » de cette famille d'inhibiteurs.

Le CB-103, alors encore uniquement en développement clinique, a attiré mon attention en raison d'un mécanisme d'action tout à fait original : en effet, c'est un inhibiteur spécifique de NOTCH1-ICD conçu pour bloquer les formes actives dominantes de NOTCH1-ICD insensibles aux GSI (Tableau 11 et Figure 13B). En particulier, dans les travaux pré-clinique, CB-103 inhibe sélectivement le complexe de transcription du gène CSL-ICD, en tant qu'inhibiteur pan-NOTCH1.

*Tableau 11. Thérapies ciblées de NOTCH1*

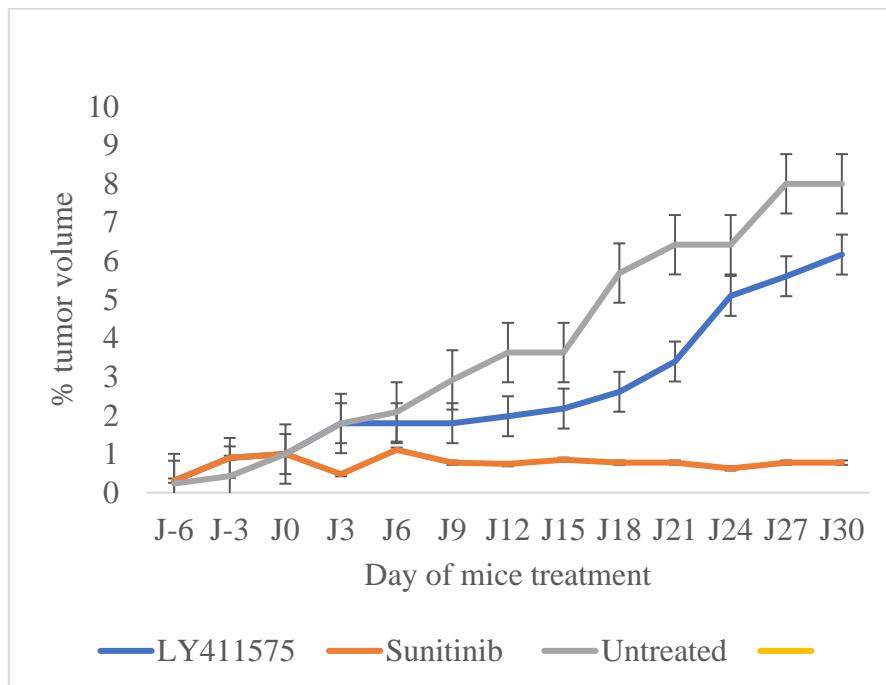
Mécanisme d'action	Nom du médicament	Phase de développement du médicament	IC <sub>50</sub> (nM)
<b>Anticorps monoclonaux anti-DLL4</b>	Demcizumab Enoticumab (REGN421) MEdI0639	Phase II Phase I Phase I	
<b>Anticorps monoclonaux anti-NOTCH1</b>	Brontictuzumab	Phase I	
<b>Inhibiteurs de <math>\gamma</math>-sécrétase (GSI)</b>	RO4929097 (R4733) LY3039478 (JSMD194) Nirogacestat (PF-03084014) AL101 (BMS-906024)	Phase II Phase I Phase III Phase II	5 0.41 13.3 1.6

**Inhibiteurs du complexe de transcription NOTCH1.**

CB-103

Phase II

En utilisant des LY411575 administrés quotidiennement par gavage, nous n'avons observé aucun effet anti-tumoral (Figure 18).



*Figure 18. La croissance de tumeurs traitées par le LY411575 en monothérapie, le sunitinib en monothérapie ( $n = 6$  par groupe de traitement)*

En revanche, en utilisant le CB-103 en monothérapie, il y avait un effet anti-tumoral significatif pour les deux modèles de xénogreffes, plus marqué avec XRCC4 qu'avec XRCC5 (Tableau 12, Figure 19, 20).

Tableau 12. Coefficient d'inhibition de croissance pour les médicaments testés dans les modèles XRCC4 et XRCC5

<b>Modèle XRCC</b>	<b>Médicament</b>	<b>Coefficient d'inhibition de croissance</b>
XRCC4	Non traité	0.92
	Sunitinib	-0.63
	CB103	-0.21
	Sunitinib+CB103	-0.65
XRCC5	Non traité	1.24
	Sunitinib	-0.60
	CB103	0.57
	Sunitinib+CB103	-0.62

En utilisant le sunitinib seul, nous avons obtenu une inhibition complète de la croissance tumorale, associée à une augmentation significative des zones nécrotiques après analyse histologique. De manière inattendue, il y avait également une forte induction de nécrose avec le CB-103 en monothérapie. L'effet additif était faible en termes d'inhibition de croissance tumorale lorsque le CB-103 et le sunitinib étaient combinés (Figure 19B et 20). Cependant, avec le traitement combiné, les effets tissulaires étaient beaucoup plus marqués qu'avec le sunitinib en monothérapie, en particulier pour l'étendue de la nécrose avec une très faible viabilité cellulaire. Il y avait également une diminution progressive significative de la densité microvasculaire chez les souris traitées ( $P < 0,01$ , Figure 19C).

Étonnamment, il y avait un effet cytotoxique direct limité sur les cellules cancéreuses, sans différence entre les souris non traitées et traitées pour le nombre de cellules apoptotiques (données non présentées). Par contre, nous avons observé une inhibition significative de la prolifération (cellules tumorales exprimant Ki67) avec le traitement combiné par rapport au groupe de souris non traitées (Figure 19D).

L'inhibition de croissance tumorale avec le CB-103 était plus marquée pour le modèle XRCC4 que pour le modèle XRCC5 (coefficient d'inhibition de la croissance de -0,21 contre 0,57 respectivement par rapport à des coefficients de 0,92 et 1,24 pour XRCC4 et XRCC5 non traités respectivement). Ce résultat est cohérent avec la fréquence allélique de la mutation *NOTCH1* plus élevée dans le modèle XRCC4. Enfin, lorsque nous avons évalué l'expression de NOTCH1-ICD et la présence de la mutation de *NOCTH1* dans les tumeurs après traitement, nous avons constaté une diminution significative pour les deux marqueurs. En particulier, pour le modèle

XRCC4 traité par CB-103 en monothérapie, la fréquence allélique de la mutation de *NOTCH1* a diminué fortement, passant de 64% à 1%, et la protéine NOTCH1-ICD n'était plus exprimée en Western blot (Figure 19E, 19F).

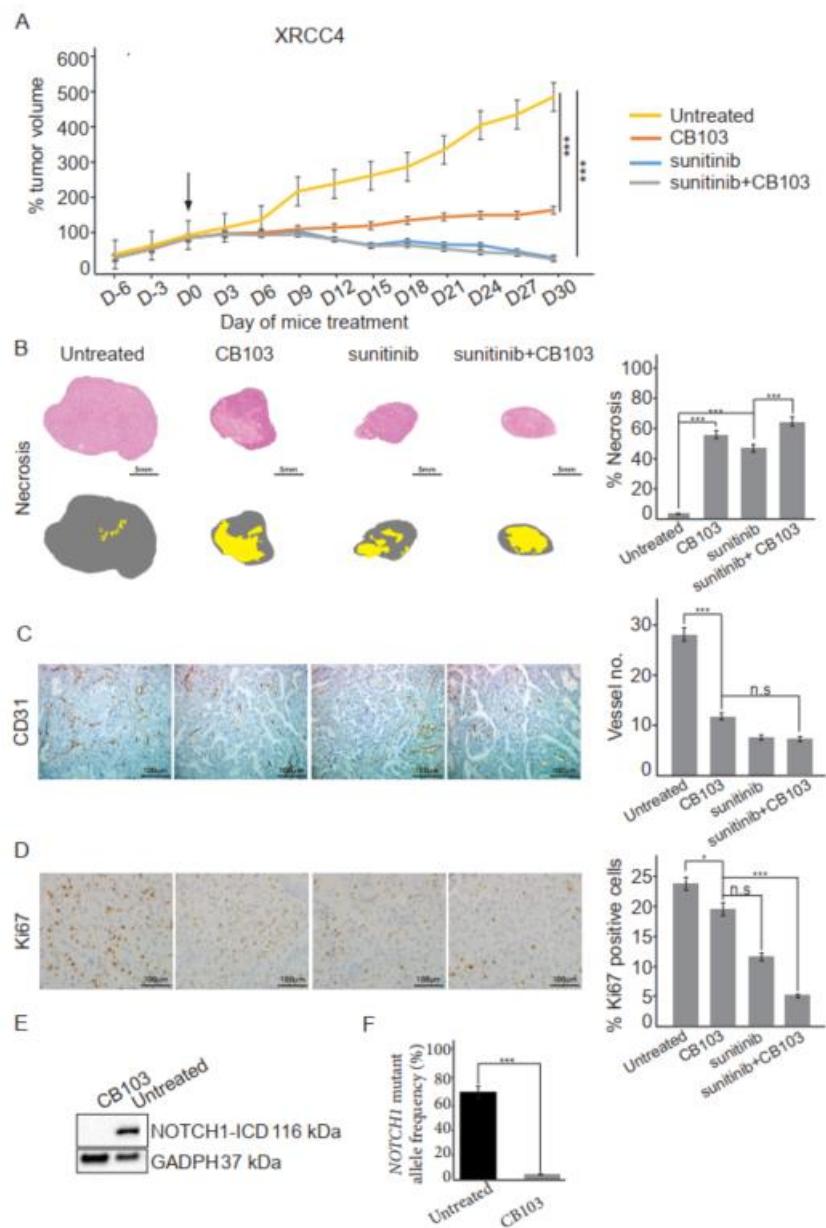


Figure 19. Effet anti-tumoral in vivo du CB-103 dans un modèle de xénogreffe XRCC4.

(A) Le CB-103 en monothérapie, le sunitinib en monothérapie ou l'association du CB-103 et du sunitinib inhibent significativement la croissance des tumeurs après 30 jours de traitement ( $n = 6$  par groupe de traitement). Ceci est associé à une augmentation progressive significative du pourcentage de zones nécrotiques (B), à une diminution significative de la densité microvasculaire (C), et de la prolifération cellulaire (D). Après 30 jours de traitement par CB-103 en monothérapie, la mutation NOTCH1 *pL1575P\_c4724T\_C* n'est plus retrouvée, et l'expression de la protéine NOTCH1-ICD disparaît en Western-Blot (E). (\* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ ).

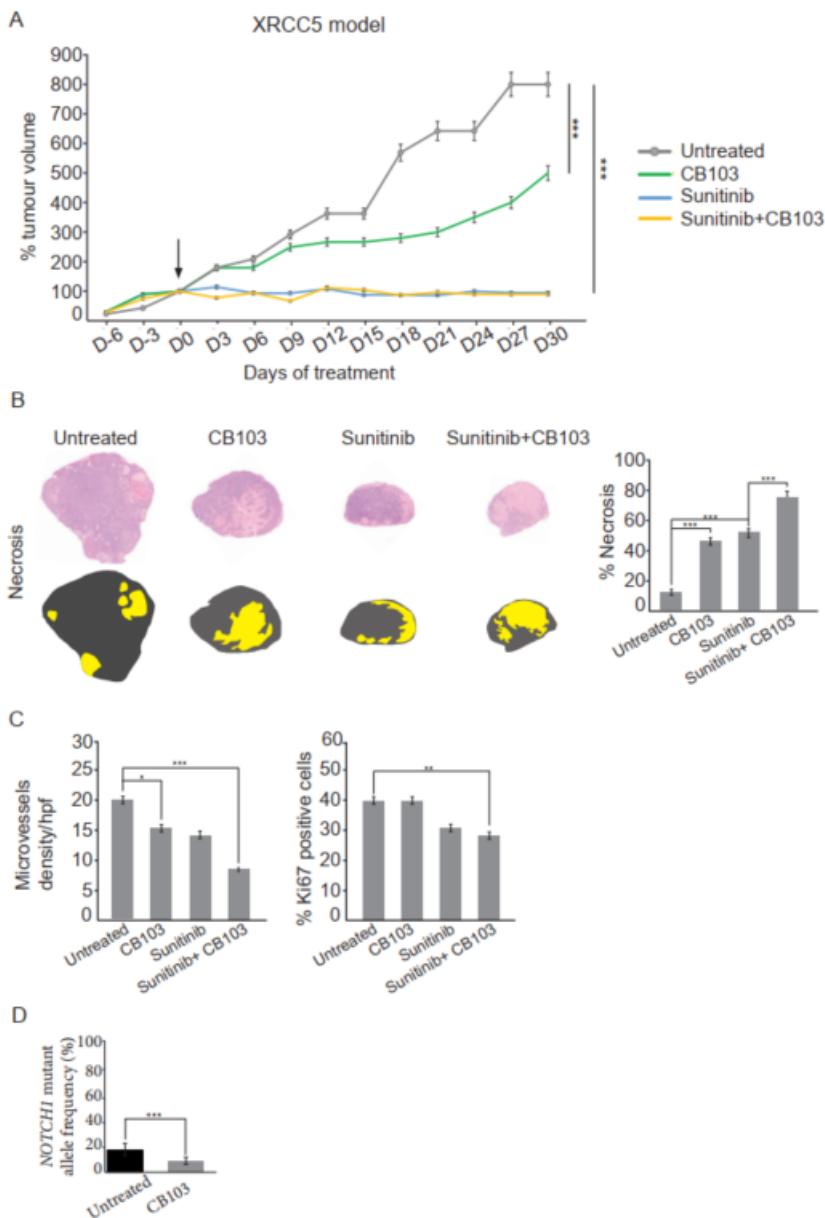


Figure 20. Effet antitumoral in vivo du CB-103 dans le modèle de xénogreffe XRCC5.

(A) Le CB-103 en monothérapie, le sunitinib en monothérapie ou l'association du CB-103 et du sunitinib inhibent significativement la croissance des tumeurs après 30 jours de traitement ( $n = 6$  par groupe de traitement). Ceci est associé à une augmentation progressive significative du pourcentage de zones nécrotiques (B), à une diminution significative de la densité microvasculaire (C), et de la prolifération cellulaire (D). Après 30 jours de traitement par CB-103 en monothérapie, la fréquence allélique de la mutation de NOTCH1 pL1575P\_c4724T\_C diminue significativement (E). (\* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ ).

### 2.3. Discussion et conclusion

En utilisant deux méthodes différentes d'analyse génomique, nous avons identifié une mutation activatrice pL1575P\_c4724T\_C de NOTCH1 dans des ccRCC métastatiques, et montré qu'il pouvait être un nouveau biomarqueur prédictif de la réponse à l'inhibition de NOTCH1-ICD.

La voie NOTCH1 est fréquemment activée dans les cancers métastatiques, y compris les ccRCC [217], et une expression élevée de NOTCH1 dans les tumeurs primitives de ccRCC est associée à un risque accru de rechute métastatique [213,218]. Dans notre étude, nous avons d'ailleurs observé une fréquence allélique de la mutation *NOTCH1* pL1575P\_c4724T\_C plus élevée après des passages successifs dans les modèles de xénogreffes, suggérant un enrichissement par ces clones agressifs, comme observé dans le processus métastatique chez les malades.

Étonnamment, cette mutation *NOTCH1*, présente dans 50-70% des LAL-T [219 220], n'avait pas encore été identifiée dans les ccRCCs. Il pourrait y avoir plusieurs raisons à cela : i) le type d'échantillon (métastases vs tumeurs primitives) ; ii) la méthode de conservation de la biopsie (congelée ou fixée en formol/dérivé formolé) ; ou iii) le type d'analyse génomique.

- Nous n'avons analysé que des échantillons métastatiques, et c'est la force de notre étude, car les clones métastatiques peuvent dériver de clones minoritaires dans la tumeur primitive. Dans notre série de 11 métastases, la mutation *NOTCH1* pL1575P\_c4724T\_C a été très fréquemment identifiée, soit par la technologie Oncoscan<sup>TM</sup>, soit par discrimination allélique en ddPCR. Dans notre récente méta-analyse de 14696 ccRCCs, nous avons retrouvé une prévalence de 2% pour les mutations de *NOTCH1*, mais dans une seule étude avec seulement 60 échantillons métastatiques [221], ce qui suggère que la prévalence des mutations de *NOTCH1* pourrait être largement sous-estimée, en lien avec d'autres facteurs que le site de prélèvement biopsique.
- Pour la méthode de conservation, la fixation au formol induit des altérations qui pourraient limiter certaines analyses génomiques [222]. La technologie Oncoscan<sup>TM</sup> est spécifiquement conçue aux échantillons fixés en formol en raison de ses sondes circularisables originales reconnaissant des séquences d'ADN <100 bp (en l'occurrence de l'ordre de 40 bp) [82]. Notre équipe de recherche a déjà éprouvé la fiabilité de cette technologie sur ce type d'échantillon. Dans une étude comparative préalablement publiée, la technologie Oncoscan<sup>TM</sup> avait une sensibilité plus élevée que le NGS pour des échantillons fixés en formol [85,234]. Dans une autre étude ayant porté sur l'analyse de deux RCC papillaires, Oncoscan<sup>TM</sup> a permis d'identifier de nouvelles altérations du nombre de copies [223]. Dans notre étude, nous avons également identifié de nouvelles altérations, dont la fréquente l'amplification du 15q11.1-11q.2 et du 9p11.2, incluant de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour les ccRCC métastatiques [236–239].

Comme pour la LAL-T [227], nous avons montré que la mutation *NOTCH1* pL1575P\_c4724T\_C est une mutation activatrice dans les ccRCC métastatiques, conduisant à

une surexpression nucléaire de NOTCH1-ICD dans les cellules cancéreuses (Figure 11, [228]). Nous avons également démontré que la mutation était présente dans les cellules endothéliales tumorales dont certaines expriment NOTCH1-ICD, ce qui était inattendu. Nous l'avons d'ailleurs montré sur les échantillons de patients, mais aussi confirmé pour les xénogreffes, ce qui est tout aussi surprenant voire davantage. En effet, dans les xénogreffes dérivées de patients, les micro-vaisseaux sont généralement d'origine murine [242] Cependant, certains micro-vaisseaux tumoraux peuvent dériver d'une trans-différentiation des cellules cancéreuses, un phénomène appelé mimétisme vasculaire ou « vascular mimicry », que nous avons décrit précédemment [243,244] C'est un élément extrêmement intéressant du développement tumoral, et surtout, il explique parfaitement l'effet anti-angiogénique marqué de l'inhibiteur sépcifique de NOTCH1-ICD que j'ai utilisé dans ce travail de Thèse de Sciences.

Pour déterminer le bénéfice du ciblage de la voie NOTCH1 dans les ccRCC métastatiques, nous avons traité les xénogreffes de ccRCC obtenues à partir de métastases avec deux inhibiteurs de NOTCH1 différents. Nous avons déjà montré que les xénogreffes dérivées de patients sont des modèles précliniques pertinents pour prédire la réponse au traitement chez les malades eux-mêmes [216,245,246]. Les inhibiteurs de NOTCH1 ont montré leur bénéfice dans des modèles précliniques de tumeurs induites par NOTCH, et des essais cliniques sont en cours dans la LAL-T, le cancer métastatique du sein et le cancer du pancréas [247–252]. En utilisant LY411575, un inhibiteur de  $\gamma$ -sécrétase (GSI), nous n'avons observé aucun effet anti-tumoral. Cet inhibiteur peut ne pas être suffisant pour prévenir le clivage de NOTCH1 au site S3. En effet, la mutation *NOTCH1* pL1575P\_c4724T\_C entraîne une modification conformationnelle du récepteur et son clivage permanent dans un NOTCH1-ICD actif. En revanche, en utilisant CB-103 conçu pour bloquer les formes actives dominantes de NOTCH1-ICD insensibles au GSI, nous avons obtenu un fort effet antitumoral, en particulier lorsque ce médicament était associé au sunitinib. *In vitro*, le CB-103 a pu inhiber la croissance de cellules dérivées de LAL-T exprimant NOTCH1-ICD alors que les GSI étaient inactifs [253]. Le CB-103 fait actuellement l'objet d'essais cliniques de phase I, II pour le LAL-T réfractaire, les carcinomes adénoïdes kystiques avancés et les cancers du sein hormonorésistants, avec un profil de toxicité acceptable [254,255]. Notre étude ouvre la voie à un développement ultérieur dans le RCC métastatique.

En utilisant deux xénogreffes différentes avec une fréquence allélique faible de la mutation de NOTCH1 pour un modèle et forte pour le second modèle, nous avons montré que la mutation *NOTCH1* pL1575P\_c4724T\_C pouvait être utilisée comme biomarqueur prédictif de la réponse à l'inhibiteur CB-103 : plus la fréquence allélique de la mutation de *NOTCH1* est élevée, plus

l'effet anti-tumoral est important. Et cela a été associé à une quasi-disparition des clones mutés après traitement. Un résultat frappant a été l'effet anti-angiogénique considérable au niveau tissulaire et cellulaire, cohérent avec la présence inattendue de la mutation de *NOTCH1* dans les micro-vaisseaux tumoraux, et cela n'avait pas été rapporté jusqu'à présent dans les études précliniques [240].

### III. PERPECTIVES

Pour comprendre de manière exhaustive et structurée la génétique des ccRCCs métastatiques, nous avons utilisé une méthode méta-analytique originale. À partir des résultats de cette analyse, nous avons identifié des voies de signalisation d'intérêt pour orienter la poursuite de notre recherche.

Surtout, notre méta-analyse, en approchant au plus près la prévalence des anomalies rapportées constitue un système de référence pour la comparaison avec de nouvelles analyses. C'est d'ailleurs ce que nous avons fait pour l'analyse Oncoscan, et un travail est en cours dans l'unité pour caractériser la génomique des cellules souches résistantes de ccRCC qui utilisera les résultats de notre méta-analyse comme comparatif.

A partir des résultats de notre étude, nous avons également démontré que la prévalence des altérations génétiques dans les localisations métastatiques était significativement plus élevée que dans les tumeurs primitives. Cette observation souligne l'importance de biopsier les métastases afin de les caractériser au mieux, et ce dans l'optique de traitements personnalisés guidés par des analyses génomiques à haut débit comme celle permises par la plateforme SeQOIA du Plan Cancer France Génomique [242].

Notre méta-analyse, mais aussi et surtout l'analyse Oncoscan, soulèvent de nombreuses questions sur la pertinence des résultats obtenus dans les analyses génétiques des tumeurs. En particulier, il est essentiel de s'appuyer sur les progrès technologiques pour affiner nos connaissances dans ce domaine qui ne cessent d'évoluer, mais il est aussi très important de confirmer par différentes techniques les anomalies identifiées.

La technologie Oncoscan est une technique alternative, intéressante dans son approche, et qui mériterait qu'elle soit associée à des analyses intégratives. Il est manifeste qu'elle offre une meilleure sensibilité de détection pour certaines anomalies que d'autres techniques. Outre la mutation de *NOTCH1* qui fait l'objet de ma Thèse, nous avons identifié tout un ensemble

d'anomalies non préalablement décrites dans les ccRCCs métastatiques et potentiellement intéressantes à étudier.

C'est le cas de l'amplification de la région 9q11.2 ou encore l'amplification du 15q11.1-11q.2, toutes deux possiblement très fréquentes. Un travail vient d'être initié avec un jeune collègue vietnamien autour du locus 15q11.2. L'objectif est de valider la présence de l'amplification de ce locus dans un plus grand nombre d'échantillons métastatiques, à la fois sur une cohorte d'échantillons de patients vietnamiens traités à l'Hôpital National K, mais aussi une cohorte de patient français pris en charge par le Professeur Bousquet. A partir de là, si nous confirmons les résultats préliminaires de l'Oncoscan, une attention particulière sera portée sur SNHG14 et la voie de signalisation qui découlerait de cette amplification. SNHG14 est un ARN non codant de type lcnARN trouvé surexprimé dans divers types de cancers. La régulation de l'expression de ses gènes cibles en piégeant différents miARN pourrait être le principal mécanisme sous-jacent aux fonctions oncogènes de SNHG14. La surexpression de SNHG14 dans les tissus tumoraux a également été observée dans plusieurs types de cancer, tels que le cancer du poumon non à petites cellules [256], le carcinome hépatocellulaire [257], le cancer du sein [258], le carcinome rénal à cellules claires [259]. Pour les ccRCCs, seul un article de biologie in vitro suggère que SNHG14 est un lncARN critique qui favoriserait la migration et l'invasion de cellules de ccRCC en piégeant le miR-203 et en augmentant N-WASP [259]. Avec nos données Oncoscan préliminaire, il nous conforte néanmoins dans l'idée de pousser plus avant ce travail.

La mutation pL1575P\_c4724T\_C de *NOTCH1*, au cœur de mon travail de Thèse a soulevé le problème de son identification, puisqu'elle n'a pu être retrouvé en séquençage Sanger, ni même en NGS whole genome (données non rapportées ici). Elle a été identifiée en Oncoscan sur tissu fixé, et en ddPCR sur tissu congelé, pour des raisons qui nous n'arrivons pas à expliquer dans l'immédiat. Des discussions ont été initiées avec deux partenaires pour essayer de mettre au point un panel NGS ciblant *NOTCH1* et le site de la mutation (Pr Lehmann-Che), mais aussi un immunomarquage avec un anticorps spécifique de la mutation sur tissu fixé (compagnie privée).

Surtout, nos travaux autour du CB-103 ouvrent des perspectives thérapeutiques intéressantes, et nous avons construit dès à présent un essai de phase I FREEDOM d'association du CB-103 avec un ITK anti-angiogénique en deuxième ligne après progression sous immunothérapie dans le traitement des ccRCCs métastatiques. L'étude FREEDOM est un essai clinique de phase I d'escalade de dose évaluant le CB-103 chez les patients atteints de cancer rénal métastatique sélectionnés en raison de la présence d'une mutation activatrice de *NOTCH1*. L'hypothèse de l'essai est que la combinaison d'axitinib et de CB-103 serait très efficace dans le traitement en

deuxième ligne chez les patients avec un ccRCC métastatique et la présence de la mutation p.(Leu1575Pro) de *NOTCH1* (Figure 21). Cet essai a trois objectifs : i) confirmer la prévalence élevée de la mutation p.(Leu1575Pro) de *NOTCH1* dans un plus large échantillon de ccRCCs métastatiques ; ii) établir le profil de toxicité et rechercher des signaux d'efficacité de l'association axitinib + CB103 ainsi que la DMT (Dose Maximale Tolérée) de cette association dans le traitement de deuxième ligne ; iii) et explorer de nouveaux outils diagnostiques pour la mutation de *NOTCH1*.

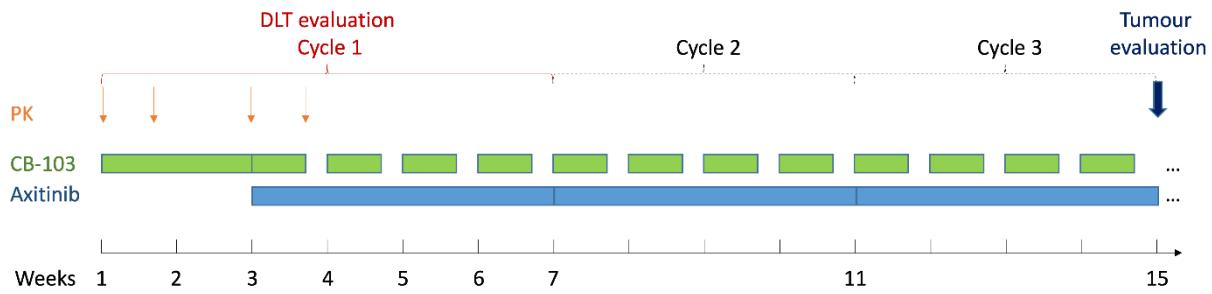


Figure 21. Programme d'études

Cet essai sera conduit en France avec 2 ou 3 centres, et s'il confirme nos résultats précliniques, un essai de phase II-III sera alors construit avec la participation de l'Hôpital National K auquel je contribuerai, étant responsable des essais dans le Centre de Recherche de l'hôpital K.

## **IV. BIBLIOGRAPHIE**

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2020;70:7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>.
- [2] Cancer today n.d. <http://gco.iarc.fr/today/home> (accessed December 21, 2020).
- [3] Padala SA, Barsouk A, Thandra KC, Saginala K, Mohammed A, Vakiti A, et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. World J Oncol 2020;11:79–87. <https://doi.org/10.14740/wjon1279>.
- [4] Batai K, Harb-De la Rosa A, Lwin A, Chaus F, Gachupin FC, Price E, et al. Racial and Ethnic Disparities in Renal Cell Carcinoma: An Analysis of Clinical Characteristics. Clinical Genitourinary Cancer 2019;17:e195–202. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2018.10.012>.
- [5] Mafolasire A, Yao X, Nawaf C, Suarez-Sarmiento A, Chow W, Zhao W, et al. Racial disparities in renal cell carcinoma: a single-payer healthcare experience. Cancer Med 2016;5:2101–8. <https://doi.org/10.1002/cam4.755>.
- [6] Chow W-H, Shuch B, Linehan WM, Devesa SS. Racial disparity in renal cell carcinoma patient survival according to demographic and clinical characteristics: Race and Renal Cell Carcinoma Survival. Cancer 2013;119:388–94. <https://doi.org/10.1002/cncr.27690>.
- [7] Sims J, Yedjou C, Abugri D, Payton M, Turner T, Miele L, et al. Racial Disparities and Preventive Measures to Renal Cell Carcinoma. IJERPH 2018;15:1089. <https://doi.org/10.3390/ijerph15061089>.
- [8] Chen VS, Abouassaly R, Gonzalez CM, Kutikov A, Smaldone MC, Meropol NJ, et al. Association of race and margin status among patients undergoing robotic partial nephrectomy for T1 renal cell carcinoma: Results from a population-based cohort.

Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 2017;35:662.e17-662.e21.  
<https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2017.07.011>.

- [9] Olshan AF, Kuo T, Meyer A, Nielsen ME, Purdue MP, Rathmell WK. Racial difference in histologic subtype of renal cell carcinoma. *Cancer Med* 2013;2:744–9.  
<https://doi.org/10.1002/cam4.110>.
- [10] Daniel CR, Cross AJ, Graubard BI, Park Y, Ward MH, Rothman N, et al. Large prospective investigation of meat intake, related mutagens, and risk of renal cell carcinoma. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2012;95:155–62.  
<https://doi.org/10.3945/ajcn.111.019364>.
- [11] Rohrmann S, Linseisen J, Overvad K, Lund Würtz AM, Roswall N, Tjønneland A, et al. Meat and fish consumption and the risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition: Meat and Fish Consumption and the Risk of Renal Cell Carcinoma. *Int J Cancer* 2015;136:E423–31.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.29236>.
- [12] Zhao J, Zhao L. Cruciferous Vegetables Intake Is Associated with Lower Risk of Renal Cell Carcinoma: Evidence from a Meta-Analysis of Observational Studies. *PLoS ONE* 2013;8:e75732. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075732>.
- [13] Liu B, Mao Q, Wang X, Zhou F, Luo J, Wang C, et al. Cruciferous Vegetables Consumption and Risk of Renal Cell Carcinoma: A Meta-Analysis. *Nutrition and Cancer* 2013;65:668–76. <https://doi.org/10.1080/01635581.2013.795980>.
- [14] Weikert S, Boeing H, Pischon T, Olsen A, Tjønneland A, Overvad K, et al. Fruits and vegetables and renal cell carcinoma: Findings from the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int J Cancer* 2006;118:3133–9.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.21765>.

- [15] Macleod LC, Hotaling JM, Wright JL, Davenport MT, Gore JL, Harper J, et al. Risk Factors for Renal Cell Carcinoma in the VITAL Study. *Journal of Urology* 2013;190:1657–61. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.04.130>.
- [16] Deckers IAG, van den Brandt PA, van Engeland M, Soetekouw PMMB, Baldewijns MMLL, Goldbohm RA, et al. Long-term dietary sodium, potassium and fluid intake; exploring potential novel risk factors for renal cell cancer in the Netherlands Cohort Study on diet and cancer. *Br J Cancer* 2014;110:797–801. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.771>.
- [17] Ren Y, Wang C, Xu J, Wang S. Cafestol and Kahweol: A Review on Their Bioactivities and Pharmacological Properties. *IJMS* 2019;20:4238. <https://doi.org/10.3390/ijms20174238>.
- [18] Makino T, Izumi K, Hiratsuka K, Kano H, Shimada T, Nakano T, et al. Anti-proliferative and anti-migratory properties of coffee diterpenes kahweol acetate and cafestol in human renal cancer cells. *Sci Rep* 2021;11:675. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80302-4>.
- [19] Capitanio U, Bensalah K, Bex A, Boorjian SA, Bray F, Coleman J, et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *European Urology* 2019;75:74–84. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.08.036>.
- [20] Cumberbatch MG, Rota M, Catto JWF, La Vecchia C. The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *European Urology* 2016;70:458–66. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.06.042>.
- [21] Minami T, Inoue M, Sawada N, Yamaji T, Iwasaki M, Tsugane S. Alcohol consumption, tobacco smoking, and subsequent risk of renal cell carcinoma: The JPHC study. *Cancer Sci* 2021;112:5068–77. <https://doi.org/10.1111/cas.15129>.

- [22] Leiba A, Kark JD, Afek A, Derazne E, Barchana M, Tzur D, et al. Adolescent Obesity and Paternal Country of Origin Predict Renal Cell Carcinoma: A Cohort Study of 1.1 Million 16 to 19-Year-Old Males. *Journal of Urology* 2013;189:25–9. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.08.184>.
- [23] Sawada N, Inoue M, Sasazuki S, Iwasaki M, Yamaji T, Shimazu T, et al. Body Mass Index and Subsequent Risk of Kidney Cancer: A Prospective Cohort Study in Japan. *Annals of Epidemiology* 2010;20:466–72. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2010.03.008>.
- [24] Gago-Dominguez M, Castelao JE. Lipid peroxidation and renal cell carcinoma: further supportive evidence and new mechanistic insights. *Free Radical Biology and Medicine* 2006;40:721–33. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.026>.
- [25] Ishikane S, Takahashi-Yanaga F. The role of angiotensin II in cancer metastasis: Potential of renin-angiotensin system blockade as a treatment for cancer metastasis. *Biochemical Pharmacology* 2018;151:96–103. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.03.008>.
- [26] Miyajima A, Yazawa S, Kosaka T, Tanaka N, Shirotake S, Mizuno R, et al. Prognostic Impact of Renin–Angiotensin System Blockade on Renal Cell Carcinoma After Surgery. *Ann Surg Oncol* 2015;22:3751–9. <https://doi.org/10.1245/s10434-015-4436-0>.
- [27] McKay RR, Rodriguez GE, Lin X, Kaymakcalan MD, Hamnvik O-PR, Sabbisetti VS, et al. Angiotensin System Inhibitors and Survival Outcomes in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Cancer Research* 2015;21:2471–9. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2332>.
- [28] Joh H-K, Willett WC, Cho E. Type 2 Diabetes and the Risk of Renal Cell Cancer in Women. *Diabetes Care* 2011;34:1552–6. <https://doi.org/10.2337/dc11-0132>.

- [29] Häggström C, Rapp K, Stocks T, Manjer J, Bjørge T, Ulmer H, et al. Metabolic Factors Associated with Risk of Renal Cell Carcinoma. *PLoS ONE* 2013;8:e57475. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057475>.
- [30] Gossage L, Eisen T, Maher ER. VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nat Rev Cancer* 2015;15:55–64. <https://doi.org/10.1038/nrc3844>.
- [31] Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *European Urology* 2016;70:93–105. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.029>.
- [32] Furge KA, Tan MH, Dykema K, Kort E, Stadler W, Yao X, et al. Identification of deregulated oncogenic pathways in renal cell carcinoma: an integrated oncogenomic approach based on gene expression profiling. *Oncogene* 2007;26:1346–50. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210256>.
- [33] Volpe A, Patard JJ. Prognostic factors in renal cell carcinoma. *World J Urol* 2010;28:319–27. <https://doi.org/10.1007/s00345-010-0540-8>.
- [34] Neves JB, Vanaclocha Saiz L, Abu-Ghanem Y, Marchetti M, Tran-Dang M-A, El-Sheikh S, et al. Pattern, timing and predictors of recurrence after surgical resection of chromophobe renal cell carcinoma. *World J Urol* 2021;39:3823–31. <https://doi.org/10.1007/s00345-021-03683-9>.
- [35] Young MD, Mitchell TJ, Vieira Braga FA, Tran MGB, Stewart BJ, Ferdinand JR, et al. Single-cell transcriptomes from human kidneys reveal the cellular identity of renal tumors. *Science* 2018;361:594–9. <https://doi.org/10.1126/science.aat1699>.
- [36] Zhang Y, Narayanan SP, Mannan R, Raskind G, Wang X, Vats P, et al. Single-cell analyses of renal cell cancers reveal insights into tumor microenvironment, cell of origin,

and therapy response. Proc Natl Acad Sci U S A 2021;118:e2103240118.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.2103240118>.

- [37] Beroukhim R, Brunet J-P, Di Napoli A, Mertz KD, Seeley A, Pires MM, et al. Patterns of gene expression and copy-number alterations in von-hippel lindau disease-associated and sporadic clear cell carcinoma of the kidney. Cancer Res 2009;69:4674–81.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0146>.
- [38] Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, Maekawa S, Okuno Y, Kamura T, et al. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. Nat Genet 2013;45:860–7.  
<https://doi.org/10.1038/ng.2699>.
- [39] Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. J Clin Invest 2013;123:3664–71.  
<https://doi.org/10.1172/JCI67230>.
- [40] Peña-Llopis S, Vega-Rubín-de-Celis S, Liao A, Leng N, Pavía-Jiménez A, Wang S, et al. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. Nat Genet 2012;44:751–9.  
<https://doi.org/10.1038/ng.2323>.
- [41] Reisman D, Glaros S, Thompson EA. The SWI/SNF complex and cancer. Oncogene 2009;28:1653–68. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.4>.
- [42] Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA. Epigenetic modifications as therapeutic targets. Nat Biotechnol 2010;28:1069–78. <https://doi.org/10.1038/nbt.1678>.
- [43] Sun X-J, Wei J, Wu X-Y, Hu M, Wang L, Wang H-H, et al. Identification and characterization of a novel human histone H3 lysine 36-specific methyltransferase. J Biol Chem 2005;280:35261–71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504012200>.

- [44] Gallan AJ, Parilla M, Segal J, Ritterhouse L, Antic T. BAP1-Mutated Clear Cell Renal Cell Carcinoma. Am J Clin Pathol 2021;155:718–28. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa176>.
- [45] Uhlman DL, Nguyen PL, Manivel JC, Aeppli D, Resnick JM, Fraley EE, et al. Association of Immunohistochemical Staining for p53 With Metastatic Progression and Poor Survival in Patients With Renal Cell Carcinoma. JNCI Journal of the National Cancer Institute 1994;86:1470–5. <https://doi.org/10.1093/jnci/86.19.1470>.
- [46] Bousquet G, Bouchtaoui ME, Leboeuf C, Battistella M, Varna M, Ferreira I, et al. Tracking sub-clonal *TP53* mutated tumor cells in human metastatic renal cell carcinoma. Oncotarget 2015;6:19279–89. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4220>.
- [47] 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;14:141–8. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70559-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70559-4).
- [48] Heng DYC, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C, et al. Prognostic Factors for Overall Survival in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated With Vascular Endothelial Growth Factor–Targeted Agents: Results From a Large, Multicenter Study. JCO 2009;27:5794–9. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.21.4809>.
- [49] Furge KA, Lucas KA, Takahashi M, Sugimura J, Kort EJ, Kanayama H, et al. Robust Classification of Renal Cell Carcinoma Based on Gene Expression Data and Predicted Cytogenetic Profiles. Cancer Research 2004;64:4117–21. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0534>.

- [50] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011;144:646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [51] Albiges L, Gurney H, Atduev V, Suarez C, Climent MA, Pook D, et al. Pembrolizumab plus lenvatinib as first-line therapy for advanced non-clear-cell renal cell carcinoma (KEYNOTE-B61): a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2023;24:881–91. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(23\)00276-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(23)00276-0).
- [52] 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. *JCO* 2010;28:1061–8. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.9764>.
- [53] Patil S, Figlin RA, Hutson TE, Michaelson MD, Négrier S, Kim ST, et al. Prognostic factors for progression-free and overall survival with sunitinib targeted therapy and with cytokine as first-line therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Ann Oncol* 2011;22:295–300. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq342>.
- [54] Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Oudard S, et al. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2009;27:3584–90. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.1293>.
- [55] Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356:115–24. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa065044>.
- [56] Bjarnason GA, Khalil B, Hudson JM, Williams R, Milot LM, Atri M, et al. Outcomes in patients with metastatic renal cell cancer treated with individualized sunitinib therapy: correlation with dynamic microbubble ultrasound data and review of the literature. *Urol Oncol* 2014;32:480–7. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2013.10.004>.

- [57] Najjar YG, Mittal K, Elson P, Wood L, Garcia JA, Dreicer R, et al. A 2 weeks on and 1 week off schedule of sunitinib is associated with decreased toxicity in metastatic renal cell carcinoma. Eur J Cancer 2014;50:1084–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.01.025>.
- [58] Lee JL, Kim MK, Park I, Ahn J-H, Lee DH, Ryoo HM, et al. RandomizEd phase II trial of Sunitinib four weeks on and two weeks off versus Two weeks on and One week off in metastatic clear-cell type REnal cell carcinoma: RESTORE trial. Ann Oncol 2015;26:2300–5. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv357>.
- [59] Motzer RJ, Hutson TE, McCann L, Deen K, Choueiri TK. Overall survival in renal-cell carcinoma with pazopanib versus sunitinib. N Engl J Med 2014;370:1769–70.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMc1400731>.
- [60] Motzer RJ, Hutson TE, Celli D, Reeves J, Hawkins R, Guo J, et al. Pazopanib versus Sunitinib in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. N Engl J Med 2013;369:722–31.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1303989>.
- [61] US Food and Drug Administration Label for Cabozantinib.  
[Https://WwwAccessdataFdaGov/Drugsatfda\\_docs/Label/2019/208692s003lblPdf](Https://WwwAccessdataFdaGov/Drugsatfda_docs/Label/2019/208692s003lblPdf)  
(Accessed on January 02, 2021) n.d.
- [62] Rini BI, Melichar B, Fishman MN, Oya M, Pithavala YK, Chen Y, et al. Axitinib dose titration: analyses of exposure, blood pressure and clinical response from a randomized phase II study in metastatic renal cell carcinoma. Ann Oncol 2015;26:1372–7.  
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdv103>.
- [63] Rini BI, Melichar B, Ueda T, Grünwald V, Fishman MN, Arranz JA, et al. Axitinib with or without dose titration for first-line metastatic renal-cell carcinoma: a randomised

double-blind phase 2 trial. Lancet Oncol 2013;14:1233–42.  
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70464-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70464-9).

- [64] Motzer R, Alekseev B, Rha S-Y, Porta C, Eto M, Powles T, et al. Lenvatinib plus Pembrolizumab or Everolimus for Advanced Renal Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2021;384:1289–300. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035716>.
- [65] Rini BI, Pal SK, Escudier BJ, Atkins MB, Hutson TE, Porta C, et al. Tivozanib versus sorafenib in patients with advanced renal cell carcinoma (TIVO-3): a phase 3, multicentre, randomised, controlled, open-label study. *Lancet Oncol* 2020;21:95–104. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30735-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30735-1).
- [66] Pal SK, Escudier BJ, Atkins MB, Hutson TE, Porta C, Verzoni E, et al. Final Overall Survival Results from a Phase 3 Study to Compare Tivozanib to Sorafenib as Third- or Fourth-line Therapy in Subjects with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol* 2020;78:783–5. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2020.08.007>.
- [67] Motzer RJ, Escudier B, George S, Hammers HJ, Srinivas S, Tykodi SS, et al. Nivolumab versus everolimus in patients with advanced renal cell carcinoma: Updated results with long-term follow-up of the randomized, open-label, phase 3 CheckMate 025 trial. *Cancer* 2020;126:4156–67. <https://doi.org/10.1002/cncr.33033>.
- [68] Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2015;373:1803–13. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1510665>.
- [69] Powles T, Albiges L, Bex A, Grünwald V, Porta C, Procopio G, et al. ESMO Clinical Practice Guideline update on the use of immunotherapy in early stage and advanced renal cell carcinoma. *Annals of Oncology* 2021;32:1511–9. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.09.014>.

- [70] Motzer RJ, McDermott DF, Escudier B, Burotto M, Choueiri TK, Hammers HJ, et al. Conditional survival and long-term efficacy with nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer* 2022;128:2085–97. <https://doi.org/10.1002/cncr.34180>.
- [71] Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Arén Frontera O, Melichar B, Choueiri TK, et al. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2018;378:1277–90. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1712126>.
- [72] Rini BI, Plimack ER, Stus V, Waddell T, Gafanov R, Pouliot F, et al. Pembrolizumab (pembro) plus axitinib (axi) versus sunitinib as first-line therapy for advanced clear cell renal cell carcinoma (ccRCC): Results from 42-month follow-up of KEYNOTE-426. *JCO* 2021;39:4500–4500. [https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15\\_suppl.4500](https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.4500).
- [73] Choueiri TK, Motzer RJ, Rini BI, Haanen J, Campbell MT, Venugopal B, et al. Updated efficacy results from the JAVELIN Renal 101 trial: first-line avelumab plus axitinib versus sunitinib in patients with advanced renal cell carcinoma. *Annals of Oncology* 2020;31:1030–9. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.04.010>.
- [74] Motzer RJ, Choueiri TK, Powles T, Burotto M, Bourlon MT, Hsieh JJ, et al. Nivolumab + cabozantinib (NIVO+CABO) versus sunitinib (SUN) for advanced renal cell carcinoma (aRCC): Outcomes by sarcomatoid histology and updated trial results with extended follow-up of CheckMate 9ER. *JCO* 2021;39:308–308. [https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.6\\_suppl.308](https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.6_suppl.308).
- [75] Motzer R, Alekseev B, Rha S-Y, Porta C, Eto M, Powles T, et al. Lenvatinib plus Pembrolizumab or Everolimus for Advanced Renal Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2021;384:1289–300. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035716>.

- [76] Albiges L, Choueiri T, Escudier B, Galsky M, George D, Hofmann F, et al. A Systematic Review of Sequencing and Combinations of Systemic Therapy in Metastatic Renal Cancer. European Urology 2015;67:100–10. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.04.006>.
- [77] Escudier B, Porta C, Bono P, Powles T, Eisen T, Sternberg CN, et al. Randomized, controlled, double-blind, cross-over trial assessing treatment preference for pazopanib versus sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma: PISCES Study. J Clin Oncol 2014;32:1412–8. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.50.8267>.
- [78] Makhov P, Joshi S, Ghatalia P, Kutikov A, Uzzo RG, Kolenko VM. Resistance to Systemic Therapies in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Mechanisms and Management Strategies. Molecular Cancer Therapeutics 2018;17:1355–64. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-1299>.
- [79] Beksac AT, Paulucci DJ, Blum KA, Yadav SS, Sfakianos JP, Badani KK. Heterogeneity in renal cell carcinoma. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 2017;35:507–15. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2017.05.006>.
- [80] Gasperskaja E, Kučinskas V. The most common technologies and tools for functional genome analysis. AML 2017;24:1–11. <https://doi.org/10.6001/actamedica.v24i1.3457>.
- [81] Blow N. Tissue issues. Nature 2007;448:959–60. <https://doi.org/10.1038/448959a>.
- [82] Hykin SM, Bi K, McGuire JA. Fixing Formalin: A Method to Recover Genomic-Scale DNA Sequence Data from Formalin-Fixed Museum Specimens Using High-Throughput Sequencing. PLoS ONE 2015;10:e0141579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141579>.

- [83] Hardenbol P, Banér J, Jain M, Nilsson M, Namsaraev EA, Karlin-Neumann GA, et al. Multiplexed genotyping with sequence-tagged molecular inversion probes. *Nat Biotechnol* 2003;21:673–8. <https://doi.org/10.1038/nbt821>.
- [84] Foster JM, Oumie A, Tognari FS, Vasques FR, Hau D, Taylor M, et al. Cross-laboratory validation of the OncoScan® FFPE Assay, a multiplex tool for whole genome tumour profiling. *BMC Med Genomics* 2015;8:5. <https://doi.org/10.1186/s12920-015-0079-z>.
- [85] Wood HM, Foster JM, Taylor M, Tinkler-Hundal E, Tognari FS, Wojtowicz P, et al. Comparing mutation calls in fixed tumour samples between the affymetrix OncoScan® array and PCR based next-generation sequencing. *BMC Med Genomics* 2017;10:17. <https://doi.org/10.1186/s12920-017-0254-5>.
- [86] Yu M-C, Lee C-W, Lee Y-S, Lian J-H, Tsai C-L, Liu Y-P, et al. Prediction of early-stage hepatocellular carcinoma using OncoScan chromosomal copy number aberration data. *WJG* 2017;23:7818–29. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i44.7818>.
- [87] Jung H-S, Lefferts JA, Tsongalis GJ. Utilization of the oncoscan microarray assay in cancer diagnostics. *Appl Cancer Res* 2017;37:1. <https://doi.org/10.1186/s41241-016-0007-3>.
- [88] Wang Y, Cottman M, Schiffman JD. Molecular inversion probes: a novel microarray technology and its application in cancer research. *Cancer Genetics* 2012;205:341–55. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2012.06.005>.
- [89] Bui TO, Dao VT, Nguyen VT, Feugeas J-P, Pamoukdjian F, Bousquet G. Genomics of Clear-cell Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *European Urology* 2022:S0302283821022193. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2021.12.010>.
- [90] Stewart LA, Clarke M, Rovers M, Riley RD, Simmonds M, Stewart G, et al. Preferred Reporting Items for a Systematic Review and Meta-analysis of Individual Participant

Data: The PRISMA-IPD Statement. JAMA 2015;313:1657–65.  
<https://doi.org/10.1001/jama.2015.3656>.

- [91] Sohani ZN, Meyre D, de Souza RJ, Joseph PG, Gandhi M, Dennis BB, et al. Assessing the quality of published genetic association studies in meta-analyses: the quality of genetic studies (Q-Genie) tool. BMC Genetics 2015;16:50. <https://doi.org/10.1186/s12863-015-0211-2>.
- [92] Hakimi AA, Attalla K, DiNatale RG, Ostrovnaya I, Flynn J, Blum KA, et al. A pan-cancer analysis of PBAF complex mutations and their association with immunotherapy response. Nat Commun 2020;11:4168. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17965-0>.
- [93] Braun DA, Hou Y, Bakouny Z, Ficial M, Sant' Angelo M, Forman J, et al. Interplay of somatic alterations and immune infiltration modulates response to PD-1 blockade in advanced clear cell renal cell carcinoma. Nat Med 2020;26:909–18. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0839-y>.
- [94] Feronika P, Kats-Ugurlu G, Haryana SM, Utoro T, Rinonce HT, Danarto R, et al. Mutational heterogeneity between different regional tumour grades of clear cell renal cell carcinoma. Experimental and Molecular Pathology 2020;115:104431. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2020.104431>.
- [95] Correa AF, Ruth KJ, Al-Saleem T, Pei J, Dulaimi E, Kister D, et al. Overall tumor genomic instability: an important predictor of recurrence-free survival in patients with localized clear cell renal cell carcinoma. Cancer Biology & Therapy 2020;21:424–31. <https://doi.org/10.1080/15384047.2020.1721251>.
- [96] Wang X-M, Lu Y, Song Y-M, Dong J, Li R-Y, Wang G-L, et al. Integrative genomic study of Chinese clear cell renal cell carcinoma reveals features associated with thrombus. Nat Commun 2020;11:739. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14601-9>.

- [97] Hu, Zeng, Liu. A Gene Signature of Survival Prediction for Kidney Renal Cell Carcinoma by Multi-Omic Data Analysis. IJMS 2019;20:5720. <https://doi.org/10.3390/ijms20225720>.
- [98] Clark DJ, Dhanasekaran SM, Petralia F, Pan J, Song X, Hu Y, et al. Integrated Proteogenomic Characterization of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. Cell 2019;179:964-983.e31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.007>.
- [99] Nassar AH, Hamieh L, Gray KP, Thorner AR, Fay AP, Lasseter KD, et al. Mutations and Response to Rapalogs in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. Mol Cancer Ther 2020;19:690–6. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-19-0642>.
- [100] Nejati R, Wei S, Uzzo RG, Poureghbali S, Pei J, Talarchek JN, et al. Monosomy of Chromosome 9 Is Associated With Higher Grade, Advanced Stage, and Adverse Outcome in Clear-cell Renal Cell Carcinoma. Clinical Genitourinary Cancer 2020;18:56–61. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2019.09.016>.
- [101] Palumbo C, Furlan M, Balzarini P, Zanotelli T, Cozzoli A, Veccia A, et al. Long-term Prognostic Impact of Chromosome Abnormalities in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. Anticancer Res 2019;39:2757–65. <https://doi.org/10.21873/anticanres.13402>.
- [102] Zhang S, Wang B, Zhang F, Ye J, Ge L, Ma L. Genomic Alterations of Renal Cell Carcinoma and Clinical Implications in the Chinese Population. Med Sci Monit 2019;25:2959–65. <https://doi.org/10.12659/MSM.914493>.
- [103] Chen J, Chen J, He F, Huang Y, Lu S, Fan H, et al. Design of a Targeted Sequencing Assay to Detect Rare Mutations in Circulating Tumor DNA. Genetic Testing and Molecular Biomarkers 2019;23:264–9. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2018.0173>.

- [104] Grimm J, Zeuschner P, Janssen M, Wagenpfeil S, Hartmann A, Stöhr C, et al. Metastatic risk stratification of clear cell renal cell carcinoma patients based on genomic aberrations. *Genes Chromosomes Cancer* 2019;gcc.22749. <https://doi.org/10.1002/gcc.22749>.
- [105] Huang Y, Wang J, Jia P, Li X, Pei G, Wang C, et al. Clonal architectures predict clinical outcome in clear cell renal cell carcinoma. *Nat Commun* 2019;10:1245. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09241-7>.
- [106] Stenehjem DD, Hahn AW, Gill DM, Albertson D, Gowrishankar B, Merriman J, et al. Predictive genomic markers of response to VEGF targeted therapy in metastatic renal cell carcinoma. *PLoS ONE* 2019;14:e0210415. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210415>.
- [107] Bihr S, Ohashi R, Moore AL, Rüschoff JH, Beisel C, Hermanns T, et al. Expression and Mutation Patterns of PBRM1, BAP1 and SETD2 Mirror Specific Evolutionary Subtypes in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Neoplasia* 2019;21:247–56. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.12.006>.
- [108] Li J, Guo L, Chai L, Ai Z. Comprehensive Analysis of Driver Genes in Personal Genomes of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Technol Cancer Res Treat* 2019;18:153303381983096. <https://doi.org/10.1177/1533033819830966>.
- [109] Saeed K, Ojamies P, Pellinen T, Eldfors S, Turkki R, Lundin J, et al. Clonal heterogeneity influences drug responsiveness in renal cancer assessed by *ex vivo* drug testing of multiple patient-derived cancer cells: Subclone-specific therapeutic approach for renal cancer. *Int J Cancer* 2019;144:1356–66. <https://doi.org/10.1002/ijc.31815>.
- [110] Voss MH, Reising A, Cheng Y, Patel P, Marker M, Kuo F, et al. Genomically annotated risk model for advanced renal-cell carcinoma: a retrospective cohort study. *The Lancet Oncology* 2018;19:1688–98. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30648-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30648-X).

- [111] Warsow G, Hübschmann D, Kleinheinz K, Nientiedt C, Heller M, Van Coile L, et al. Genomic features of renal cell carcinoma with venous tumor thrombus. *Sci Rep* 2018;8:7477. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25544-z>.
- [112] de Velasco G, Wankowicz SA, Madison R, Ali SM, Norton C, Duquette A, et al. Targeted genomic landscape of metastases compared to primary tumours in clear cell metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2018;118:1238–42. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0064-3>.
- [113] Turajlic S, Xu H, Litchfield K, Rowan A, Chambers T, Lopez JI, et al. Tracking Cancer Evolution Reveals Constrained Routes to Metastases: TRACERx Renal. *Cell* 2018;173:581-594.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.057>.
- [114] Turajlic S, Xu H, Litchfield K, Rowan A, Horswell S, Chambers T, et al. Deterministic Evolutionary Trajectories Influence Primary Tumor Growth: TRACERx Renal. *Cell* 2018;173:595-610.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.043>.
- [115] Mitchell TJ, Turajlic S, Rowan A, Nicol D, Farmery JHR, O'Brien T, et al. Timing the Landmark Events in the Evolution of Clear Cell Renal Cell Cancer: TRACERx Renal. *Cell* 2018;173:611-623.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.020>.
- [116] Nouhaud F-X, Blanchard F, Sesboue R, Flaman J-M, Sabourin J-C, Pfister C, et al. Clinical Relevance of Gene Copy Number Variation in Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Clinical Genitourinary Cancer* 2018;16:e795–805. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2018.02.013>.
- [117] Manley BJ, Reznik E, Ghanaat M, Kashan M, Becerra MF, Casuscelli J, et al. Characterizing recurrent and lethal small renal masses in clear cell renal cell carcinoma using recurrent somatic mutations. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2019;37:12–7. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2017.10.012>.

- [118] Becerra MF, Reznik E, Redzematovic A, Tennenbaum DM, Kashan M, Ghanaat M, et al. Comparative Genomic Profiling of Matched Primary and Metastatic Tumors in Renal Cell Carcinoma. European Urology Focus 2018;4:986–94. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2017.09.016>.
- [119] Casuscelli J, Becerra MF, Manley BJ, Zabor EC, Reznik E, Redzematovic A, et al. Characterization and Impact of TERT Promoter Region Mutations on Clinical Outcome in Renal Cell Carcinoma. European Urology Focus 2019;5:642–9. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2017.09.008>.
- [120] Wei X, Choudhury Y, Lim WK, Anema J, Kahnoski RJ, Lane B, et al. Recognizing the Continuous Nature of Expression Heterogeneity and Clinical Outcomes in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. Sci Rep 2017;7:7342. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07191-y>.
- [121] Mikhailenko DS, Zhinzhilo TA, Kolpakov AV, Kekeeva TV, Strel'nikov VV, Nemtsova MV, et al. Specific Localization of Missense Mutations in the VHL Gene in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. Bull Exp Biol Med 2017;163:465–8. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3829-4>.
- [122] Dagher J, Kammerer-Jacquet S-F, Dugay F, Beaumont M, Lespagnol A, Cornevin L, et al. Clear cell renal cell carcinoma: a comparative study of histological and chromosomal characteristics between primary tumors and their corresponding metastases. Virchows Arch 2017;471:107–15. <https://doi.org/10.1007/s00428-017-2124-0>.
- [123] Li J, Guo L, Ai Z. An integrated analysis of cancer genes in clear cell renal cell carcinoma. Future Oncology 2017;13:715–25. <https://doi.org/10.2217/fon-2016-0473>.
- [124] Wang Y, Guo X, Bray MJ, Ding Z, Zhao Z. An integrative genomics approach for identifying novel functional consequences of PBRM1 truncated mutations in clear cell

renal cell carcinoma (ccRCC). BMC Genomics 2016;17:515.

<https://doi.org/10.1186/s12864-016-2906-9>.

- [125] Kouba EJ, Eble JN, Simper N, Grignon DJ, Wang M, Zhang S, et al. High fidelity of driver chromosomal alterations among primary and metastatic renal cell carcinomas: implications for tumor clonal evolution and treatment. *Mod Pathol* 2016;29:1347–57. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.133>.
- [126] Razafinjatovo C, Bihl S, Mischo A, Vogl U, Schmidinger M, Moch H, et al. Characterization of VHL missense mutations in sporadic clear cell renal cell carcinoma: hotspots, affected binding domains, functional impact on pVHL and therapeutic relevance. *BMC Cancer* 2016;16:638. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2688-0>.
- [127] Manley BJ, Zabor EC, Casuscelli J, Tennenbaum DM, Redzematovic A, Becerra MF, et al. Integration of Recurrent Somatic Mutations with Clinical Outcomes: A Pooled Analysis of 1049 Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol Focus* 2017;3:421–7. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2016.06.015>.
- [128] Lim SM, Park HS, Kim S, Kim S, Ali SM, Greenbowe JR, et al. Next-generation sequencing reveals somatic mutations that confer exceptional response to everolimus. *Oncotarget* 2016;7:10547–56. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7234>.
- [129] Togo Y, Yoshikawa Y, Suzuki T, Nakano Y, Kanematsu A, Zozumi M, et al. Genomic profiling of the genes on chromosome 3p in sporadic clear cell renal cell carcinoma. *Int J Oncol* 2016;48:1571–80. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3395>.
- [130] Köhn L, Svenson U, Ljungberg B, Roos G. Specific genomic aberrations predict survival, but low mutation rate in cancer hot spots, in clear cell renal cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2015;23:334–42. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000087>.

- [131] Kang X-L, Zou H, Pang LJ, Hu WH, Zhao J, Qi Y, et al. Chromosomal imbalances revealed in primary renal cell carcinomas by comparative genomic hybridization. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:3636–47.
- [132] Kanu N, Grönroos E, Martinez P, Burrell RA, Yi Goh X, Bartkova J, et al. SETD2 loss-of-function promotes renal cancer branched evolution through replication stress and impaired DNA repair. *Oncogene* 2015;34:5699–708. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.24>.
- [133] Beuselinck B, Job S, Becht E, Karadimou A, Verkarre V, Couchy G, et al. Molecular subtypes of clear cell renal cell carcinoma are associated with sunitinib response in the metastatic setting. *Clin Cancer Res* 2015;21:1329–39. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1128>.
- [134] Scelo G, Riazalhosseini Y, Greger L, Letourneau L, González-Porta M, Wozniak MB, et al. Variation in genomic landscape of clear cell renal cell carcinoma across Europe. *Nat Commun* 2014;5:5135. <https://doi.org/10.1038/ncomms6135>.
- [135] Alves MR, Carneiro FC, Lavorato-Rocha AM, da Costa WH, da Cunha IW, de Cássio Zequi S, et al. Mutational status of VHL gene and its clinical importance in renal clear cell carcinoma. *Virchows Arch* 2014;465:321–30. <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1629-z>.
- [136] Gerlinger M, Horswell S, Larkin J, Rowan AJ, Salm MP, Varela I, et al. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat Genet* 2014;46:225–33. <https://doi.org/10.1038/ng.2891>.
- [137] Muscarella LA, D'Agruma L, la Torre A, Gigante M, Coco M, Parrella P, et al. VHL gene alterations in Italian patients with isolated renal cell carcinomas. *Int J Biol Markers* 2013;28:208–15. <https://doi.org/10.5301/jbm.5000011>.

- [138] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 2013;499:43–9. <https://doi.org/10.1038/nature12222>.
- [139] Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883–92. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1113205>.
- [140] Guo G, Gui Y, Gao S, Tang A, Hu X, Huang Y, et al. Frequent mutations of genes encoding ubiquitin-mediated proteolysis pathway components in clear cell renal cell carcinoma. *Nat Genet* 2011;44:17–9. <https://doi.org/10.1038/ng.1014>.
- [141] Dondeti VR, Wubbenhorst B, Lal P, Gordan JD, D'Andrea K, Attiyeh EF, et al. Integrative genomic analyses of sporadic clear cell renal cell carcinoma define disease subtypes and potential new therapeutic targets. *Cancer Res* 2012;72:112–21. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1698>.
- [142] Moore LE, Nickerson ML, Brennan P, Toro JR, Jaeger E, Rinsky J, et al. Von Hippel-Lindau (VHL) inactivation in sporadic clear cell renal cancer: associations with germline VHL polymorphisms and etiologic risk factors. *PLoS Genet* 2011;7:e1002312. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002312>.
- [143] Monzon FA, Alvarez K, Peterson L, Truong L, Amato RJ, Hernandez-McClain J, et al. Chromosome 14q loss defines a molecular subtype of clear-cell renal cell carcinoma associated with poor prognosis. *Mod Pathol* 2011;24:1470–9. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.107>.
- [144] Rechsteiner MP, von Teichman A, Nowicka A, Sulser T, Schraml P, Moch H. VHL gene mutations and their effects on hypoxia inducible factor HIF $\alpha$ : identification of potential

driver and passenger mutations. *Cancer Res* 2011;71:5500–11.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0757>.

- [145] Varela I, Tarpey P, Raine K, Huang D, Ong CK, Stephens P, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature* 2011;469:539–42. <https://doi.org/10.1038/nature09639>.
- [146] La Rochelle J, Klatte T, Dastane A, Rao N, Seligson D, Said J, et al. Chromosome 9p deletions identify an aggressive phenotype of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 2010;116:4696–702. <https://doi.org/10.1002/cncr.25279>.
- [147] Kuroda N, Tamura M, Shiotsu T, Nakamura S, Taguchi T, Tominaga A, et al. Chromosomal abnormalities of clear cell renal cell carcinoma: frequent gain of chromosome 7. *Pathol Int* 2010;60:9–13. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2009.02467.x>.
- [148] Chen M, Ye Y, Yang H, Tamboli P, Matin S, Tannir NM, et al. Genome-wide profiling of chromosomal alterations in renal cell carcinoma using high-density single nucleotide polymorphism arrays. *Int J Cancer* 2009;125:2342–8. <https://doi.org/10.1002/ijc.24642>.
- [149] Cheng L, MacLennan GT, Zhang S, Wang M, Zhou M, Tan P-H, et al. Evidence for polyclonal origin of multifocal clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:8087–93. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1494>.
- [150] Arai E, Ushijima S, Tsuda H, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, et al. Genetic clustering of clear cell renal cell carcinoma based on array-comparative genomic hybridization: its association with DNA methylation alteration and patient outcome. *Clin Cancer Res* 2008;14:5531–9. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0443>.

- [151] Nickerson ML, Jaeger E, Shi Y, Durocher JA, Mahurkar S, Zaridze D, et al. Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. *Clin Cancer Res* 2008;14:4726–34. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4921>.
- [152] Smits KM, Schouten LJ, van Dijk BAC, Hulsbergen-van de Kaa CA, Wouters KAD, Oosterwijk E, et al. Genetic and epigenetic alterations in the von hippel-lindau gene: the influence on renal cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 2008;14:782–7. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1753>.
- [153] Cifola I, Spinelli R, Beltrame L, Peano C, Fasoli E, Ferrero S, et al. Genome-wide screening of copy number alterations and LOH events in renal cell carcinomas and integration with gene expression profile. *Mol Cancer* 2008;7:6. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-7-6>.
- [154] Yoshimoto T, Matsuura K, Karnan S, Tagawa H, Nakada C, Tanigawa M, et al. High-resolution analysis of DNA copy number alterations and gene expression in renal clear cell carcinoma. *J Pathol* 2007;213:392–401. <https://doi.org/10.1002/path.2239>.
- [155] Giménez-Bachs JM, Salinas-Sánchez AS, Sánchez-Sánchez F, Lorenzo-Romero JG, Donate-Moreno MJ, Pastor-Navarro H, et al. VHL Protein Alterations in Sporadic Renal Cell Carcinoma. *Cancer Clinical Oncology* 2007;19:784–9. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2007.08.014>.
- [156] Brunelli M, Eccher A, Gobbo S, Ficarra V, Novara G, Cossu-Rocca P, et al. Loss of chromosome 9p is an independent prognostic factor in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Mod Pathol* 2008;21:1–6. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800967>.
- [157] Hirata H, Matsuyama H, Matsumoto H, Korenaga Y, Ohmi C, Sakano S, et al. Deletion mapping of 18q in conventional renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;163:101–5. <https://doi.org/10.1016/j.cancergenryo.2005.03.010>.

- [158] Nagao K, Yamaguchi S, Matsuyama H, Korenaga Y, Hirata H, Yoshihiro S, et al. Allelic loss of 3p25 associated with alterations of 5q22.3 approximately q23.2 may affect the prognosis of conventional renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;160:43–8. <https://doi.org/10.1016/j.cancergenryo.2004.11.015>.
- [159] Kim JH, Jung CW, Cho YH, Lee J, Lee S-H, Kim HY, et al. Somatic VHL alteration and its impact on prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep* 2005;13:859–64.
- [160] Kaku H, Ito S, Ebara S, Ouchida M, Nasu Y, Tsushima T, et al. Positive correlation between allelic loss at chromosome 14q24-31 and poor prognosis of patients with renal cell carcinoma. *Urology* 2004;64:176–81. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2004.03.015>.
- [161] Junker K, Romics I, Szendroi A, Riesz P, Moravek P, Hindermann W, et al. Genetic profile of bone metastases in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2004;45:320–4. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2003.11.017>.
- [162] Kallio JP, Mahlamäki EH, Helin H, Karhu R, Kellokumpu-Lehtinen P, Tammela TLJ. Chromosomal gains and losses detected by comparative genomic hybridization and proliferation activity in renal cell carcinoma. *Scand J Urol Nephrol* 2004;38:225–30. <https://doi.org/10.1080/00365590310025399>.
- [163] Junker K, Sänger J, Schmidt A, Hindermann W, Presselt N, Helfritzsch H, et al. Genetic characterization of lung metastases in renal cell carcinoma. *Oncol Rep* 2003;10:1035–8.
- [164] Sanz-Casla MT, Maestro ML, del Barco V, Zanna I, Moreno J, Vidaurreta M, et al. Loss of heterozygosity and methylation of p16 in renal cell carcinoma. *Urol Res* 2003;31:159–62. <https://doi.org/10.1007/s00240-003-0308-3>.

- [165] Yamaguchi S, Yoshihiro S, Matsuyama H, Nagao K, Fukunaga K, Matsumoto H, et al. The allelic loss of chromosome 3p25 with c-myc gain is related to the development of clear-cell renal cell carcinoma. *Clin Genet* 2003;63:184–91. <https://doi.org/10.1034/j.1399-0004.2003.00035.x>.
- [166] Sükösd F, Kuroda N, Beothe T, Kaur AP, Kovacs G. Deletion of chromosome 3p14.2-p25 involving the VHL and FHIT genes in conventional renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:455–7.
- [167] Junker K, Weirich G, Amin MB, Moravek P, Hindermann W, Schubert J. Genetic subtyping of renal cell carcinoma by comparative genomic hybridization. *Recent Results Cancer Res* 2003;162:169–75. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-59349-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-642-59349-9_15).
- [168] Yao M, Yoshida M, Kishida T, Nakaigawa N, Baba M, Kobayashi K, et al. VHL tumor suppressor gene alterations associated with good prognosis in sporadic clear-cell renal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1569–75. <https://doi.org/10.1093/jnci/94.20.1569>.
- [169] Fukunaga K, Wada T, Matsumoto H, Yoshihiro S, Matsuyama H, Naito K. Renal cell carcinoma: allelic loss at chromosome 9 using the fluorescent multiplex-polymerase chain reaction technique. *Hum Pathol* 2002;33:910–4. <https://doi.org/10.1053/hupa.2002.126877>.
- [170] Mitsumori K, Kittleson JM, Itoh N, Delahunt B, Heathcott RW, Stewart JH, et al. Chromosome 14q LOH in localized clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol* 2002;198:110–4. <https://doi.org/10.1002/path.1165>.
- [171] Kondo K, Yao M, Yoshida M, Kishida T, Shuin T, Miura T, et al. Comprehensive mutational analysis of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: relationship to clinicopathological parameters. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;34:58–68. <https://doi.org/10.1002/gcc.10054>.

- [172] Presti JC, Wilhelm M, Reuter V, Russo P, Motzer R, Waldman F. Allelic loss on chromosomes 8 and 9 correlates with clinical outcome in locally advanced clear cell carcinoma of the kidney. *J Urol* 2002;167:1464–8.
- [173] Schraml P, Struckmann K, Hatz F, Sonnet S, Kully C, Gasser T, et al. VHL mutations and their correlation with tumour cell proliferation, microvessel density, and patient prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol* 2002;196:186–93. <https://doi.org/10.1002/path.1034>.
- [174] Parry L, Maynard JH, Patel A, Clifford SC, Morrissey C, Maher ER, et al. Analysis of the TSC1 and TSC2 genes in sporadic renal cell carcinomas. *Br J Cancer* 2001;85:1226–30. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.2072>.
- [175] Grady B, Goharderakhshan R, Chang J, Ribeiro-Filho LA, Perinchery G, Franks J, et al. Frequently deleted loci on chromosome 9 may harbor several tumor suppressor genes in human renal cell carcinoma. *J Urol* 2001;166:1088–92.
- [176] Reutzel D, Mende M, Naumann S, Störkel S, Brenner W, Zabel B, et al. Genomic imbalances in 61 renal cancers from the proximal tubulus detected by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 2001;93:221–7. <https://doi.org/10.1159/000056987>.
- [177] Junker K, Moravek P, Podhola M, Weirich G, Hindermann W, Janitzky V, et al. Genetic alterations in metastatic renal cell carcinoma detected by comparative genomic hybridization: correlation with clinical and histological data. *Int J Oncol* 2000;17:903–8. <https://doi.org/10.3892/ijo.17.5.903>.
- [178] Maestro ML, del Barco V, Sanz-Casla MT, Moreno J, Adrover E, Izquierdo L, et al. Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in renal cancer. *Oncology* 2000;59:126–30. <https://doi.org/10.1159/000012149>.

- [179] Bissig H, Richter J, Desper R, Meier V, Schraml P, Schäffer AA, et al. Evaluation of the clonal relationship between primary and metastatic renal cell carcinoma by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 1999;155:267–74. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65120-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65120-6).
- [180] Velickovic M, Delahunt B, Grebe SK. Loss of heterozygosity at 3p14.2 in clear cell renal cell carcinoma is an early event and is highly localized to the FHIT gene locus. *Cancer Res* 1999;59:1323–6.
- [181] Gallou C, Joly D, Méjean A, Staroz F, Martin N, Tarlet G, et al. Mutations of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: definition of a risk factor for VHL patients to develop an RCC. *Hum Mutat* 1999;13:464–75. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1999\)13:6<464::AID-HUMU6>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1999)13:6<464::AID-HUMU6>3.0.CO;2-A).
- [182] Kawasaki T, Bilim V, Takahashi K, Tomita Y. Infrequent alteration of p53 pathway in metastatic renal cell carcinoma. *Oncol Rep* 1999;6:329–33. <https://doi.org/10.3892/or.6.2.329>.
- [183] Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. *The American Journal of Pathology* 2002;161:1961–71. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64472-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64472-0).
- [184] Gaffney E, Riegman P, Grizzle W, Watson P. Factors that drive the increasing use of FFPE tissue in basic and translational cancer research. *Biotechnic & Histochemistry* 2018;93:373–86. <https://doi.org/10.1080/10520295.2018.1446101>.
- [185] Pongor LS, Munkácsy G, Vereczkey I, Pete I, Győrffy B. Currently favored sampling practices for tumor sequencing can produce optimal results in the clinical setting. *Sci Rep* 2020;10:14403. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71382-3>.

- [186] Litchfield K, Reading JL, Puttick C, Thakkar K, Abbosh C, Bentham R, et al. Meta-analysis of tumor- and T cell-intrinsic mechanisms of sensitization to checkpoint inhibition. *Cell* 2021;184:596-614.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.002>.
- [187] Kim JH, Kim HS, Kim BJ. Prognostic value of KRAS mutation in advanced non-small-cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors: A meta-analysis and review. *Oncotarget* 2017;8:48248–52. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17594>.
- [188] Ricketts CJ, De Cubas AA, Fan H, Smith CC, Lang M, Reznik E, et al. The Cancer Genome Atlas Comprehensive Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma. *Cell Reports* 2018;23:313-326.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.075>.
- [189] Ho TH, Choueiri TK, Wang K, Karam JA, Chalmers Z, Frampton G, et al. Correlation Between Molecular Subclassifications of Clear Cell Renal Cell Carcinoma and Targeted Therapy Response. *Eur Urol Focus* 2016;2:204–9. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2015.11.007>.
- [190] Fay AP, de Velasco G, Ho TH, Van Allen EM, Murray B, Albiges L, et al. Whole-Exome Sequencing in Two Extreme Phenotypes of Response to VEGF-Targeted Therapies in Patients With Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Natl Compr Canc Netw* 2016;14:820–4. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2016.0086>.
- [191] Voss MH, Reising A, Cheng Y, Patel P, Marker M, Kuo F, et al. Genomically annotated risk model for advanced renal-cell carcinoma: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol* 2018;19:1688–98. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30648-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30648-X).
- [192] McDermott DF, Huseni MA, Atkins MB, Motzer RJ, Rini BI, Escudier B, et al. Clinical activity and molecular correlates of response to atezolizumab alone or in combination with bevacizumab versus sunitinib in renal cell carcinoma. *Nat Med* 2018;24:749–57. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0053-3>.

- [193] Carril-Auria L, Santos M, Roldán-Romero JM, Rodriguez-Antona C, de Velasco G. Prognostic and Predictive Value of PBRM1 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancers* (Basel) 2019;12:E16. <https://doi.org/10.3390/cancers12010016>.
- [194] Braun DA, Ishii Y, Walsh AM, Van Allen EM, Wu CJ, Shukla SA, et al. Clinical Validation of PBRM1 Alterations as a Marker of Immune Checkpoint Inhibitor Response in Renal Cell Carcinoma. *JAMA Oncol* 2019;5:1631–3. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.3158>.
- [195] Bi K, He MX, Bakouny Z, Kanodia A, Napolitano S, Wu J, et al. Tumor and immune reprogramming during immunotherapy in advanced renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 2021;39:649–661.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.02.015>.
- [196] Chakiryan NH, Hajiran A, Kim Y, Aydin AM, Zemp L, Katende E, et al. Correlating Immune Cell Infiltration Patterns with Recurrent Somatic Mutations in Advanced Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol Focus* 2021:S2405-4569(21)00120-6. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2021.04.014>.
- [197] Bousquet G, El Bouchtaoui M, Leboeuf C, Battistella M, Varna M, Ferreira I, et al. Tracking sub-clonal TP53 mutated tumor cells in human metastatic renal cell carcinoma. *Oncotarget* 2015;6:19279–89. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4220>.
- [198] Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, Russo P, Mazumdar M. Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2002;20:289–96. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.1.289>.
- [199] Ravaud A, Motzer RJ, Pandha HS, George DJ, Pantuck AJ, Patel A, et al. Adjuvant Sunitinib in High-Risk Renal-Cell Carcinoma after Nephrectomy. *N Engl J Med* 2016;375:2246–54. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611406>.

- [200] Girgis AH, Iakovlev VV, Beheshti B, Bayani J, Squire JA, Bui A, et al. Multilevel whole-genome analysis reveals candidate biomarkers in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2012;72:5273–84. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0656>.
- [201] Lichner Z, Scorilas A, White NMA, Girgis AH, Rotstein L, Wiegand KC, et al. The chromatin remodeling gene ARID1A is a new prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2013;182:1163–70. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.01.007>.
- [202] Wu JN, Roberts CWM. ARID1A mutations in cancer: another epigenetic tumor suppressor? *Cancer Discov* 2013;3:35–43. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0361>.
- [203] Bertucci F, Finetti P, Guille A, Adélaïde J, Garnier S, Carbuccia N, et al. Comparative genomic analysis of primary tumors and metastases in breast cancer. *Oncotarget* 2016;7:27208–19. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8349>.
- [204] Hasskarl J. Everolimus. Recent Results Cancer Res 2018;211:101–23. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-91442-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-91442-8_8).
- [205] Kotulak-Chrzaszcz A, Klacz J, Matuszewski M, Kmiec Z, Wierzbicki P. Expression of the Sonic Hedgehog pathway components in clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Lett* 2019. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10919>.
- [206] Wen JL, Wen XF, Li RB, Jin YC, Wang XL, Zhou L, et al. UBE3C Promotes Growth and Metastasis of Renal Cell Carcinoma via Activating Wnt/β-Catenin Pathway. *PLoS ONE* 2015;10:e0115622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115622>.
- [207] Bousquet G, El Bouchtaoui M, Sophie T, Leboeuf C, de Bazelaire C, Ratajczak P, et al. Targeting autophagic cancer stem-cells to reverse chemoresistance in human triple

negative breast cancer. Oncotarget 2017;8:35205–21.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.16925>.

- [208] Varna M, Gapihan G, Feugeas J-P, Ratajczak P, Tan S, Ferreira I, et al. Stem cells increase in numbers in perinecrotic areas in human renal cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21:916–24. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0666>.
- [209] Chen D, Sun X, Zhang X, Cao J. Inhibition of the CDK4/6-Cyclin D-Rb Pathway by Ribociclib Augments Chemotherapy and Immunotherapy in Renal Cell Carcinoma. *Biomed Res Int* 2020;2020:9525207. <https://doi.org/10.1155/2020/9525207>.
- [210] Turner NC, Slamon DJ, Ro J, Bondarenko I, Im S-A, Masuda N, et al. Overall Survival with Palbociclib and Fulvestrant in Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* 2018;379:1926–36. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1810527>.
- [211] Griffin GK, Wu J, Iracheta-Vellve A, Patti JC, Hsu J, Davis T, et al. Epigenetic silencing by SETDB1 suppresses tumour intrinsic immunogenicity. *Nature* 2021. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03520-4>.
- [212] Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2019;19:133–50. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0116-x>.
- [213] Raimondi A, Sepe P, Zattarin E, Mennitto A, Stellato M, Claps M, et al. Predictive Biomarkers of Response to Immunotherapy in Metastatic Renal Cell Cancer. *Front Oncol* 2020;10:1644. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01644>.
- [214] Bui TO, Angeli E, El Bouchtaoui M, Gapihan G, Dao VT, Paris J, et al. Metastatic clear-cell renal cell carcinoma: a frequent NOTCH1 mutation predictive of response to anti-NOTCH1 CB-103 treatment. *Exp Hematol Oncol* 2023;12:46. <https://doi.org/10.1186/s40164-023-00408-z>.

- [215] Hrebien S, O'Leary B, Beaney M, Schiavon G, Fribbens C, Bhambra A, et al. Reproducibility of Digital PCR Assays for Circulating Tumor DNA Analysis in Advanced Breast Cancer. PLoS ONE 2016;11:e0165023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165023>.
- [216] Bousquet G, El Bouchtaoui M, Sophie T, Leboeuf C, de Bazelaire C, Ratajczak P, et al. Targeting autophagic cancer stem-cells to reverse chemoresistance in human triple negative breast cancer. Oncotarget 2017;8:35205–21. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16925>.
- [217] U.S. Department of Health and Human Services National Institutes of Health Office of Laboratory Animal Welfare. Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals 2015.
- [218] Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. Survival and Prognostic Stratification of 670 Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma. JCO 1999;17:2530–2530. <https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.8.2530>.
- [219] Lin L, Cai J. Circular RNA circ-EGLN3 promotes renal cell carcinoma proliferation and aggressiveness via miR-1299-mediated IRF7 activation. J of Cellular Biochemistry 2020;121:4377–85. <https://doi.org/10.1002/jcb.29620>.
- [220] Zhuang Z, Lin J, Huang Y, Lin T, Zheng Z, Ma X. Notch 1 is a valuable therapeutic target against cell survival and proliferation in clear cell renal cell carcinoma. Oncology Letters 2017;14:3437–44. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6587>.
- [221] Bhagat TD, Zou Y, Huang S, Park J, Palmer MB, Hu C, et al. Notch Pathway Is Activated via Genetic and Epigenetic Alterations and Is a Therapeutic Target in Clear Cell Renal Cancer. J Biol Chem 2017;292:837–46. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.745208>.

- [222] Wu K, Hu L, Hou J. Selective suppression of Notch1 inhibits proliferation of renal cell carcinoma cells through JNK/p38 pathway. *Oncology Reports* 2016;35:2795–800. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4687>.
- [223] Jędroszka D, Orzechowska M, Bednarek AK. Predictive values of Notch signalling in renal carcinoma. *Aoms* 2017;6:1249–54. <https://doi.org/10.5114/aoms.2017.65649>.
- [224] Ai Q, Ma X, Huang Q, Liu S, Shi T, Zhang C, et al. High-Level Expression of Notch1 Increased the Risk of Metastasis in T1 Stage Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *PLoS ONE* 2012;7:e35022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035022>.
- [225] Shah PA, Huang C, Li Q, Kazi SA, Byers LA, Wang J, et al. NOTCH1 Signaling in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cells* 2020;9:2677. <https://doi.org/10.3390/cells9122677>.
- [226] Malecki MJ, Sanchez-Irizarry C, Mitchell JL, Histen G, Xu ML, Aster JC, et al. Leukemia-Associated Mutations within the NOTCH1 Heterodimerization Domain Fall into at Least Two Distinct Mechanistic Classes. *Mol Cell Biol* 2006;26:4642–51. <https://doi.org/10.1128/MCB.01655-05>.
- [227] Varna M, Gapihan G, Feugeas J-P, Ratajczak P, Tan S, Ferreira I, et al. Stem Cells Increase in Numbers in Perinecrotic Areas in Human Renal Cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21:916–24. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0666>.
- [228] Zhu H, Zhou X, Redfield S, He Z, Lewin J, Miele L. Elevated Expression of Notch1 Is Associated With Metastasis of Human Malignancies. *Int J Surg Pathol* 2013;21:449–54. <https://doi.org/10.1177/1066896913496146>.
- [229] Liu S, Ma X, Ai Q, Huang Q, Shi T, Zhu M, et al. NOTCH1 functions as an oncogene by regulating the PTEN/PI3K/AKT pathway in clear cell renal cell carcinoma. *Urologic*

- [230] Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2004;306:269–71. <https://doi.org/10.1126/science.1102160>.
- [231] Chiang MY, Xu L, Shestova O, Histen G, L'heureux S, Romany C, et al. Leukemia-associated NOTCH1 alleles are weak tumor initiators but accelerate K-ras-initiated leukemia. *J Clin Invest* 2008;118:3181–94. <https://doi.org/10.1172/JCI35090>.
- [232] Becerra MF, Reznik E, Redzematovic A, Tennenbaum DM, Kashan M, Ghanaat M, et al. Comparative Genomic Profiling of Matched Primary and Metastatic Tumors in Renal Cell Carcinoma. *European Urology Focus* 2018;4:986–94.  
<https://doi.org/10.1016/j.euf.2017.09.016>.
- [233] Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 2002;161:1961–71.  
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64472-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64472-0).
- [234] El Bouchtaoui M, Do Cruzeiro M, Leboeuf C, Loisel-Ferreira I, Fedronie C, Ferreira C, et al. A Constitutional Activating MET Mutation Makes the Genetic Link between Malignancies and Chronic Inflammatory Diseases. *Clin Cancer Res* 2019;25:4504–15.  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3261>.
- [235] Alexiev BA, Zou YS. Clear cell papillary renal cell carcinoma: a chromosomal microarray analysis of two cases using a novel Molecular Inversion Probe (MIP) technology. *Pathol Res Pract* 2014;210:1049–53.  
<https://doi.org/10.1016/j.prp.2014.10.001>.

- [236] Beaudenon S, Huibregtse JM. HPV E6, E6AP and cervical cancer. *BMC Biochem* 2008;9 Suppl 1:S4. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-9-S1-S4>.
- [237] Luo Q, Cui M, Deng Q, Liu J. Comprehensive analysis of differentially expressed profiles and reconstruction of a competing endogenous RNA network in papillary renal cell carcinoma. *Mol Med Rep* 2019;19:4685–96. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10138>.
- [238] Liu G, Ye Z, Zhao X, Ji Z. SP1-induced up-regulation of lncRNA SNHG14 as a ceRNA promotes migration and invasion of clear cell renal cell carcinoma by regulating N-WASP. *Am J Cancer Res* 2017;7:2515–25.
- [239] Lin L, Cai J. Circular RNA circ-EGLN3 promotes renal cell carcinoma proliferation and aggressiveness via miR-1299-mediated IRF7 activation. *J Cell Biochem* 2020;121:4377–85. <https://doi.org/10.1002/jcb.29620>.
- [240] Lin C, Zheng H, Wang C, Yang L, Chen S, Li B, et al. Mutations increased overexpression of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell Int* 2012;12:13. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-12-13>.
- [241] Sanchez-Irizarry C, Carpenter AC, Weng AP, Pear WS, Aster JC, Blacklow SC. Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats. *Mol Cell Biol* 2004;24:9265–73. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.21.9265-9273.2004>.
- [242] Hylander BL, Punt N, Tang H, Hillman J, Vaughan M, Bshara W, et al. Origin of the vasculature supporting growth of primary patient tumor xenografts. *J Transl Med* 2013;11:110. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-110>.

- [243] Serova M, Tijeras-Raballand A, Dos Santos C, Martinet M, Neuzillet C, Lopez A, et al. Everolimus affects vasculogenic mimicry in renal carcinoma resistant to sunitinib. *Oncotarget* 2016;7:38467–86. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9542>.
- [244] Angara K, Borin TF, Arbab AS. Vascular Mimicry: A Novel Neovascularization Mechanism Driving Anti-Angiogenic Therapy (AAT) Resistance in Glioblastoma. *Transl Oncol* 2017;10:650–60. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2017.04.007>.
- [245] Bousquet G, Feugeas J-P, Ferreira I, Vercellino L, Jourdan N, Bertheau P, et al. Individual xenograft as a personalized therapeutic resort for women with metastatic triple-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res* 2014;16:401. <https://doi.org/10.1186/bcr3615>.
- [246] Bousquet G, Janin A. Patient-Derived Xenograft: An Adjuvant Technology for the Treatment of Metastatic Disease. *Pathobiology* 2016;83:170–6. <https://doi.org/10.1159/000444533>.
- [247] Hu ZI, Bendell JC, Bullock A, LoConte NK, Hatoum H, Ritch P, et al. A randomized phase II trial of nab-paclitaxel and gemcitabine with tarextumab or placebo in patients with untreated metastatic pancreatic cancer. *Cancer Med* 2019;8:5148–57. <https://doi.org/10.1002/cam4.2425>.
- [248] Minuzzo S, Agnusdei V, Pusceddu I, Pinazza M, Moserle L, Masiero M, et al. DLL4 regulates NOTCH signaling and growth of T acute lymphoblastic leukemia cells in NOD/SCID mice. *Carcinogenesis* 2015;36:115–21. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu223>.
- [249] Yen W-C, Fischer MM, Axelrod F, Bond C, Cain J, Cancilla B, et al. Targeting Notch signaling with a Notch2/Notch3 antagonist (tarextumab) inhibits tumor growth and

decreases tumor-initiating cell frequency. *Clin Cancer Res* 2015;21:2084–95. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2808>.

- [250] Han J, Shen Q. Targeting  $\gamma$ -secretase in breast cancer. *Breast Cancer* (Dove Med Press) 2012;4:83–90. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S26437>.
- [251] Massard C, Azaro A, Soria J-C, Lassen U, Le Tourneau C, Sarker D, et al. First-in-human study of LY3039478, an oral Notch signaling inhibitor in advanced or metastatic cancer. *Ann Oncol* 2018;29:1911–7. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy244>.
- [252] Zheng R, Li M, Wang S, Liu Y. Advances of target therapy on NOTCH1 signaling pathway in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol Oncol* 2020;9:31. <https://doi.org/10.1186/s40164-020-00187-x>.
- [253] Lehal R, Zaric J, Vigolo M, Urech C, Frismantas V, Zangerer N, et al. Pharmacological disruption of the Notch transcription factor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020;117:16292–301. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922606117>.
- [254] Jose e P-G, Javier C, Anastasios s S, Rogier M, Elena L-M, Analía A, et al. First-in-human phase 1-2A study of CB-103, an oral Protein-Protein Interaction Inhibitor targeting pan-NOTCH signalling in advanced solid tumors and blood malignancies. ASCO Annual Meeting 2018 2018.
- [255] Hanna GJ, Stathis A, Lopez-Miranda E, Racca F, Quon D, Leyvraz S, et al. A Phase I Study of the Pan-Notch Inhibitor CB-103 for Patients with Advanced Adenoid Cystic Carcinoma and Other Tumors. *Cancer Res Commun* 2023;3:1853–61. <https://doi.org/10.1158/2767-9764.CRC-23-0333>.
- [256] Zhang Z, Wang Y, Zhang W, Li J, Liu W, Lu W. Long non-coding RNA SNHG14 exerts oncogenic functions in non-small cell lung cancer through acting as an *miR-340* sponge. *Bioscience Reports* 2019;39:BSR20180941. <https://doi.org/10.1042/BSR20180941>.

- [257] Pu J, Wei H, Tan C, Qin B, Zhang Y, Wang A, et al. Long noncoding RNA SNHG14 facilitates hepatocellular carcinoma progression through regulating miR-4673/SOCS1. Am J Transl Res 2019;11:5897–904.
- [258] Dong H, Wang W, Mo S, Liu Q, Chen X, Chen R, et al. Long non-coding RNA SNHG14 induces trastuzumab resistance of breast cancer via regulating *PABPC1* expression through H3K27 acetylation. J Cellular Molecular Medi 2018;22:4935–47. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13758>.
- [259] Liu G, Ye Z, Zhao X, Ji Z. SP1-induced up-regulation of lncRNA SNHG14 as a ceRNA promotes migration and invasion of clear cell renal cell carcinoma by regulating N-WASP. Am J Cancer Res 2017;7:2515–25.

## **V. ANNEXE**

## **Annexe 1 : L'analyse de la mutation *NOTCH1***

L'analyse de la mutation *NOTCH1* a été réalisée par séquençage direct des transcrits *NOTCH1* amplifiés par transcription inverse (RT)-PCR. Les échantillons tumoraux ont été analysés par séquençage direct des produits PCR en expansion des exons *NOTCH1* englobant les séquences codant pour les domaines MH.

Les séquences d'amorces étaient les suivantes :

exon FW: GACCAGTACTGCAAGCACCA

exon RV: CAGGAAGTGGAAAGGAGCTGT

Sonde NOTCH1 12772 c.4724T>C p.L1575P

**Annexe 2 : Caractéristiques des cinq modèles de xénogreffes dérivées de patients**

	<b>Âge à l'échantillonnage chirurgical</b>	<b>Histological type</b>	<b>Grade Furhman</b>	<b>Localisations métastatiques</b>
	<b>Biopsie pré-traitement</b>	<b>Biopsie post-traitement</b>		
HRCC1	+	Cellule claires	3	Poumon, os
HRCC2	+	Cellule claires	2	Poumon
HRCC3		+	4	Os
HRCC4	+	Cellule claires	4	Poumon, foie
HRCC5	+	Cellule claires	4	Poumon

**Annexe 3 : Liste des gènes situés dans les locus 9p11.2, 15q11.1 et 15q11.2**

ID	Locus	Gène	Référence	Fonction dans le cancer du rein
1	9p11.2	<i>MIR1299</i>	1. Lin., <i>J Cell Biochem.</i> , 2020	MIR1299 encodes the acting circRNA and circ-EGLN3, which promotes renal cell carcinoma proliferation by regulating of IRF7 expression
2		<i>CNTNAP3B</i>		Unknown
3		<i>FOXD4L6</i>		Unknown
4		<i>CBWD6</i>		Unknown
5		<i>PGM5P2</i>		Unknown
6		<i>SPATA31A6</i>		Unknown
7		<i>ANKRD20A2P</i>		Unknown
8		<i>MEP1AP1</i>		Unknown
9		<i>PTS-P1</i>		Unknown
10		<i>FAM27E2</i>		Unknown
11		<i>FAM95B1</i>		Unknown
12		<i>GXYLT1P3</i>		Unknown
13		<i>MIR4477A</i>		Unknown
14		<i>BMS1P14</i>		Unknown
15		<i>FRG1HP</i>		Unknown
16		<i>RPL7AP45</i>		Unknown
17		<i>LOC100132004</i>		Unknown
18		<i>LINC00268</i>		Unknown
19		<i>RNA5SP530</i>		Unknown
20		<i>RN7SL565P</i>		Unknown
21		<i>RN7SL343P</i>		Unknown
22		<i>IGKV1OR9-2</i>		Unknown
23		<i>RNU6-1269P</i>		Unknown
24		<i>RNU6-156P</i>		Unknown
25		<i>FAM242F</i>		Unknown
26		<i>AQP7P5</i>		Unknown
27		<i>LOC102724580</i>		Unknown
28		<i>CDRT15P14</i>		Unknown
29		<i>CDRT15P6</i>		Unknown
30		<i>SNX18P8</i>		Unknown
31		<i>CDK2AP2P1</i>		Unknown
32		<i>RBM17P3</i>		Unknown
33		<i>VN2R6P</i>		Unknown
34		<i>FAM27D1</i>		Unknown

35	<i>CNN2P2</i>		Unknown
36	<i>MYO5BP1</i>		Unknown
37	<i>PTGER4P1</i>		Unknown
38	<i>LOC440896</i>		Unknown
39	<i>LOC107984035</i>		Unknown
40	<i>LOC112268035</i>		Unknown
41	<i>LOC112268034</i>		Unknown
42	<i>LOC112268033</i>		Unknown
43	<i>LOC107987000</i>		Unknown
44	<i>LOC107986999</i>		Unknown
45	<i>LOC107986998</i>		Unknown
46	<i>LOC107986997</i>		Unknown
47	<i>LOC107986995</i>		Unknown
48	<i>LOC107986993</i>		Unknown
49	<i>LOC107986992</i>		Unknown
50	<i>LOC107986991</i>		Unknown
51	<i>LOC107984006</i>		Unknown
52	<i>LOC105376065</i>		Unknown
53	<i>LOC105376063</i>		Unknown
54	<i>LOC105376060</i>		Unknown
55	<i>LOC105376058</i>		Unknown
56	<i>LOC105376057</i>		Unknown
57	<i>LOC105369249</i>		Unknown
58	<i>LOC103047893</i>		Unknown
59	<i>LOC102724431</i>		Unknown
60	<i>LOC101928906</i>		Unknown
61	<i>LOC100421691</i>		Unknown
62	<i>LOC100420440</i>		Unknown
63	<i>LOC100419924</i>		Unknown
64	<i>LOC100419690</i>		Unknown
65	15q11.1		Unknown
66		<i>CHEK2P2</i>	Unknown
67		<i>IGHV1OR15-9</i>	Unknown
68		<i>BMS1P15</i>	Unknown
69		<i>IGHV1OR15-2</i>	Unknown
70		<i>IGHV3OR15-7</i>	Unknown
71		<i>RHPN2P1</i>	Unknown
72		<i>SLC20A1P3</i>	Unknown
73		<i>RN7SL584P</i>	Unknown
74		<i>RNU6-978P</i>	Unknown

75	15q11.2	<i>FAM30B</i>	Unknown
76		<i>BCAR1P1</i>	Unknown
77		<i>LOC105379203</i>	Unknown
78		<i>LOC646071</i>	Unknown
79	<i>UBE3A</i>	1. Wu, Genet Mol Res., 2016	UBF3A (known as E6AP) is an enzyme that is involved in protein targeting for degradation
80		1. Jiang., Front Genet., 2021	SNRPN is one of the RNA-binding proteins, with a role in the post-transcriptional regulation of gene expression. These RNA-binding proteins are related to known cancer biomarkers (such as BCL2, promoting ovarian cancer cell survival...). Thus, dysfunctional RNA-binding protein can lead to oncogenes in pRCC.
81		2. Munroe, Front Immunol., 2021	
82		3. Schweinfest., Cancer Res., 1997	
83		4. Schuster., Lab Invest., 2003	
84		5. Larsson., Cell., 1995	
85		6. Richards., J Exp Med., 1998	
86		7. Kondo., Oncogene., 1995	
87	<i>SNHG14</i>	1. Liu., Am J Cancer Res., 2017	SNHG14 is a long non-coding RNA, that promotes ccRCC cell migration and invasion by acting as a competing endogenous RNA.
88		2. Wang., BMC Nephrol., 2020	
89	<i>PWRN1</i>	1. Qing., Mol Med Rep., 2019	PWRN1 is a long non-coding RNA, that promotes pRCC cell migration and invasion by acting as a competing endogenous RNA.
90	<i>DEL15Q11.2</i>		Unknown
91	<i>MKRN3</i>		Unknown
92	<i>CYFIP1</i>		Unknown
93	<i>NDN</i>		Unknown
94	<i>NIPA1</i>		Unknown
95	<i>MAGEL2</i>		Unknown
96	<i>LOC102724971</i>		Unknown
97	<i>SNURF</i>		Unknown
98	<i>NPAPI</i>		Unknown
99	<i>NIPA2</i>		Unknown
100	<i>TUBGCP5</i>		Unknown
101	<i>PWRN2</i>		Unknown

102	<i>SNORD116-1</i>	Unknown
103	<i>PWARI</i>	Unknown
104	<i>IPW</i>	Unknown
105	<i>PWAR5</i>	Unknown
106	<i>SNORD115-1</i>	Unknown
107	<i>POTEB</i>	Unknown
108	<i>HERC2P2</i>	Unknown
109	<i>POTEB3</i>	Unknown
110	<i>NBEAPI</i>	Unknown
111	<i>PWARSN</i>	Unknown
112	<i>NF1P1</i>	Unknown
113	<i>SNORD116@</i>	Unknown
114	<i>GOLGA6L2</i>	Unknown
115	<i>IGHV10R15-1</i>	Unknown
116	<i>POTEB2</i>	Unknown
117	<i>HERC2P6</i>	Unknown
118	<i>MIR4508</i>	Unknown
119	<i>NF1P2</i>	Unknown
120	<i>OR4N4</i>	Unknown
121	<i>PWAR6</i>	Unknown
122	<i>GOLGA6L22</i>	Unknown
123	<i>IGHV10R15-3</i>	Unknown
124	<i>SNORD115-48</i>	Unknown
125	<i>SNORD115-44</i>	Unknown
126	<i>SNORD115-43</i>	Unknown
127	<i>SNORD115-42</i>	Unknown
128	<i>SNORD115-41</i>	Unknown
129	<i>SNORD115-40</i>	Unknown
130	<i>SNORD115-39</i>	Unknown
131	<i>SNORD115-38</i>	Unknown
132	<i>SNORD115-37</i>	Unknown
133	<i>SNORD115-36</i>	Unknown
134	<i>SNORD115-35</i>	Unknown
135	<i>SNORD115-34</i>	Unknown
136	<i>SNORD115-33</i>	Unknown
137	<i>SNORD115-32</i>	Unknown
138	<i>SNORD115-31</i>	Unknown
139	<i>SNORD115-30</i>	Unknown
140	<i>SNORD115-29</i>	Unknown
141	<i>SNORD115-26</i>	Unknown

142	<i>SNORD115-25</i>	Unknown
143	<i>SNORD115-23</i>	Unknown
144	<i>SNORD115-22</i>	Unknown
145	<i>SNORD115-21</i>	Unknown
146	<i>SNORD115-20</i>	Unknown
147	<i>SNORD115-19</i>	Unknown
148	<i>SNORD115-18</i>	Unknown
149	<i>SNORD115-17</i>	Unknown
150	<i>SNORD115-16</i>	Unknown
151	<i>SNORD115-15</i>	Unknown
152	<i>SNORD115-14</i>	Unknown
153	<i>SNORD115-13</i>	Unknown
154	<i>SNORD115-12</i>	Unknown
155	<i>SNORD115-11</i>	Unknown
156	<i>SNORD115-10</i>	Unknown
157	<i>SNORD115-9</i>	Unknown
158	<i>SNORD115-8</i>	Unknown
159	<i>SNORD115-7</i>	Unknown
160	<i>SNORD115-6</i>	Unknown
161	<i>SNORD115-5</i>	Unknown
162	<i>SNORD115-4</i>	Unknown
163	<i>SNORD115-3</i>	Unknown
164	<i>SNORD115-2</i>	Unknown
165	<i>MIR5701-1</i>	Unknown
166	<i>GOLGA6L6</i>	Unknown
167	<i>GOLGA6L1</i>	Unknown
168	<i>IGHV10R15-5</i>	Unknown
169	<i>PWAR4</i>	Unknown
170	<i>SNORD116-18</i>	Unknown
171	<i>SNORD116-6</i>	Unknown
172	<i>SNORD116-21</i>	Unknown
173	<i>MIR1268A</i>	Unknown
174	<i>SNORD116-27</i>	Unknown
175	<i>SNORD116-26</i>	Unknown
176	<i>SNORD116-20</i>	Unknown
177	<i>SNORD116-14</i>	Unknown
178	<i>SNORD116-13</i>	Unknown
179	<i>SNORD116-7</i>	Unknown
180	<i>SNORD116-19</i>	Unknown
181	<i>GOLGA8DP</i>	Unknown

182	<i>ABCB10P1</i>	Unknown
183	<i>WHAMMP3</i>	Unknown
184	<i>GOLGA8CP</i>	Unknown
185	<i>SNORD116-29</i>	Unknown
186	<i>SNORD116-24</i>	Unknown
187	<i>SNORD116-22</i>	Unknown
188	<i>SNORD116-8</i>	Unknown
189	<i>SNORD116-5</i>	Unknown
190	<i>SNORD116-4</i>	Unknown
191	<i>IGHV4OR15-8</i>	Unknown
192	<i>SNORD116-28</i>	Unknown
193	<i>SNORD116-25</i>	Unknown
194	<i>SNORD116-23</i>	Unknown
195	<i>SNORD116-17</i>	Unknown
196	<i>SNORD116-16</i>	Unknown
197	<i>SNORD116-15</i>	Unknown
198	<i>SNORD116-12</i>	Unknown
199	<i>SNORD116-11</i>	Unknown
200	<i>SNORD116-10</i>	Unknown
201	<i>SNORD116-9</i>	Unknown
202	<i>SNORD116-3</i>	Unknown
203	<i>SNORD116-2</i>	Unknown
204	<i>GOLGA8IP</i>	Unknown
205	<i>SNORD109B</i>	Unknown
206	<i>OR4H6P</i>	Unknown
207	<i>GOLGA8S</i>	Unknown
208	<i>SNORD115-46</i>	Unknown
209	<i>SNORD116-30</i>	Unknown
210	<i>SNORD115-47</i>	Unknown
211	<i>SNORD115-45</i>	Unknown
212	<i>SNORD115-28</i>	Unknown
213	<i>SNORD115-27</i>	Unknown
214	<i>SNORD115-24</i>	Unknown
215	<i>LINC02203</i>	Unknown
216	<i>LINC01193</i>	Unknown
217	<i>HERC2P7</i>	Unknown
218	<i>SNORD64</i>	Unknown
219	<i>SNORD109A</i>	Unknown
220	<i>SNORD108</i>	Unknown
221	<i>SNORD107</i>	Unknown

222	<i>MIR5701-3</i>	Unknown
223	<i>MIR5701-2</i>	Unknown
224	<i>OR4M2</i>	Unknown
225	<i>IGHD1OR15-1A</i>	Unknown
226	<i>IGHD1OR15-1B</i>	Unknown
227	<i>IGHD2OR15-2A</i>	Unknown
228	<i>IGHD2OR15-2B</i>	Unknown
229	<i>IGHD2OR15-3A</i>	Unknown
230	<i>IGHD2OR15-3B</i>	Unknown
231	<i>IGHD2OR15-4A</i>	Unknown
232	<i>IGHD2OR15-4B</i>	Unknown
233	<i>IGHD2OR15-5A</i>	Unknown
234	<i>IGHD2OR15-5B</i>	Unknown
235	<i>BMS1P16</i>	Unknown
236	<i>MIR3118-2</i>	Unknown
237	<i>MIR3118-4</i>	Unknown
238	<i>MIR3118-3</i>	Unknown
239	<i>MIR4509-1</i>	Unknown
240	<i>IGHV1OR15-4</i>	Unknown
241	<i>IGHV1OR15-6</i>	Unknown
242	<i>OR4N3BP</i>	Unknown
243	<i>OR1Q1BP</i>	Unknown
244	<i>OR11K1BP</i>	Unknown
245	<i>OR4M2B</i>	Unknown
246	<i>OR4H6BP</i>	Unknown
247	<i>OR4N4C</i>	Unknown
248	<i>GOLGA8EP</i>	Unknown
249	<i>OR4N3P</i>	Unknown
250	<i>OR11K1P</i>	Unknown
251	<i>RPS27P2</i>	Unknown
252	<i>RPL5P1</i>	Unknown
253	<i>RPS8P10</i>	Unknown
254	<i>VNIR63P</i>	Unknown
255	<i>VNIR62P</i>	Unknown
256	<i>VNIR61P</i>	Unknown
257	<i>VNIR60P</i>	Unknown
258	<i>PWRN3</i>	Unknown
259	<i>LOC642131</i>	Unknown
260	<i>RN7SL545P</i>	Unknown
261	<i>RNU6-498P</i>	Unknown

262		<i>RN7SL536P</i>		Unknown
263		<i>RN7SL400P</i>		Unknown
264		<i>RNU6-1235P</i>		Unknown
265		<i>RNU6-749P</i>		Unknown
266		<i>RNU6-741P</i>		Unknown
267		<i>RNU6-631P</i>		Unknown
268		<i>RN7SL759P</i>		Unknown
269		<i>RN7SL495P</i>		Unknown
270		<i>RN7SL106P</i>		Unknown
271		<i>PWRN4</i>		Unknown
272		<i>LOC102724737</i>		Unknown
273		<i>LOC102723623</i>		Unknown
274		<i>LOC102723534</i>		Unknown
275		<i>NF1P9</i>		Unknown
276		<i>LOC100996379</i>		Unknown
277		<i>PDCD6IPPI</i>		Unknown
278		<i>MPHOSPH10P5</i>		Unknown
279		<i>MPHOSPH10P9</i>		Unknown
280		<i>MPHOSPH10P4</i>		Unknown
281		<i>GRAMD4P6</i>		Unknown
282		<i>GRAMD4P5</i>		Unknown
283		<i>BCAR1P2</i>		Unknown
284		<i>LONRF2P4</i>		Unknown
285		<i>LONRF2P3</i>		Unknown
286		<i>NBEAP4</i>		Unknown
287		<i>DMAC1P1</i>		Unknown
288		<i>OR1IJ6P</i>		Unknown

**Annexe 4 : Résultats de l'analyse génomique de 04 patients ccRCC en utilisant la technologie Oncoscan™**

Assay Name	0008231_A11	0008231_B02	0008231_B04	0008231_B06
amp725	4.715312	3.2156634	5.1703324	4.5344191
tag100533	-1.0	11.831866	6.3235583	3.1857548
tag100535	7.177846	5.2423573	9.2314558	4.1157255
amp766	-1.0	-1.0	1.5148214	1.0298412
amp761	6.4878807	7.5783114	9.921361	2.0321229
tag100054	6.1034904	5.0451989	8.7258511	9.4866037
tag100116	2.8997612	3.6545827	0.46187055	4.725688
tag100117	0.39076245	2.8121858	8.7481365	9.5529995
amp574	3.1283891	5.7320142	3.2933941	1.3599352
tag110558	0.24737157	7.0684919	5.7840781	5.6996279
tag110868	4.4777455	3.0023041	4.6037917	4.1525626
tag110869	2.203809	1.6250321	2.8751299	2.2076585
tag110564	3.366894	4.5347466	5.3966918	5.3614697
tag110780	5.4898958	6.1730876	-1.0	8.5808907
tag110829	3.4233489	4.8727627	10.493944	6.3311257
tag111018	3.514323	7.460587	6.3377099	6.331315
tag111013	-1.0	2.9952285	4.464025	0.48083764
tag110706	-1.0	3.0463181	11.196543	9.2401018
tag100256	3.7965727	3.7674534	6.6736946	6.4557438
tag100257	1.9423587	-1.0	-1.0	0.66997266
tag100528	-1.0	-1.0	1.2079544	-1.0
tag110899	7.6677766	10.904262	-1.0	1.6389618
tag102376	2.9615827	1.854269	2.6671033	3.3214214
amp922	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
amp932	2.5798261	3.570842	4.7809787	1.9753727
amp939	-1.0	2.8369431	-1.0	0.51232553
amp940	-1.0	3.4724393	-1.0	1.4999263
tag100125	6.2188892	6.1329684	7.5856524	5.2167525
tag100080	4.8883162	2.8458502	4.0139437	3.5245829
tag100085	2.6802289	1.7322558	2.5509775	1.3652266
tag100082	4.2267132	4.2103024	4.2072988	5.1037006
tag100079	3.981343	1.5871989	3.7657022	3.7460265
tag100216	0.60130012	0.98010075	3.1019924	0.61070293
tag110819	1.7763501	3.2312067	1.7085617	6.355628
tag100219	4.6986504	-1.0	5.277534	4.613358
amp928	-1.0	-1.0	3.4058876	-1.0
amp934	-1.0	-1.0	-1.0	3.786123
tag100547	11.913697	7.7114406	7.454783	6.2152543
amp929	3.408443	1.7382764	1.607164	2.085146
tag102926	1.6795194	2.2557182	1.9121838	2.2615757
tag100546	10.130236	10.970996	1.0460038	8.925602
amp936	-1.0	-1.0	1.9941219	-1.0
amp937	-1.0	-1.0	0.25089329	-1.0
amp938	1.8521118	0.16115491	6.4049487	2.2966156

amp930	2.1277673	2.4690557	1.4861472	5.1382179
amp924	-1.0	0.12727816	0.62124145	1.8589697
tag110763	4.9730673	6.1395645	8.2267647	8.6719913
tag110943	3.8034828	11.454423	-1.0	-1.0
tag110997	3.7624173	3.7535877	3.4283509	3.6038532
tag111027	4.0125561	5.3834896	5.4289908	4.0502343
tag110729	5.9260025	10.042222	3.953567	2.9745347
amp605	1.9301199	4.8439956	-1.0	-1.0
amp604	-1.0	-1.0	-1.0	0.67024857
tag100519	6.0162621	7.1839571	4.8743892	5.5870166
amp609	4.0265732	-1.0	8.3706636	-1.0
tag100244	8.0938406	4.8835945	5.7653227	6.3918295
tag100144	5.9156423	4.3504357	4.7015004	6.1164355
tag100195	3.1362863	1.1824689	1.4571245	2.411267
tag100194	10.051488	7.6128893	1.30922	6.522615
tag102367	-1.0	5.5508652	-1.0	0.50824624
amp792	6.672256	5.8552337	5.8208294	5.3703308
tag110892	8.0715122	5.0001864	5.9223542	5.4857678
amp784	-1.0	0.5508455	1.099442	2.3392167
amp778	-1.0	15.961757	-1.0	-1.0
amp780	2.8571703	8.7695971	1.4238058	7.4576912
amp781	-1.0	-1.0	1.0634934	-1.0
amp783	-1.0	3.669868	3.0529962	1.7880006
tag101384	1.7083176	0.2657125	3.8822658	1.8572738
tag101886	2.6409543	4.2478385	5.1911955	8.0006332
amp787	-1.0	14.093289	-1.0	0.93651354
amp779	6.0806775	14.592525	5.7978086	3.7671022
tag101387	7.8100553	10.181917	5.3030701	7.8585086
amp793	0.88616407	4.4239106	0.036534164	5.2073321
amp794	5.8186097	3.1965568	3.6297941	6.1554461
tag102366	0.57031351	0.83434349	-1.0	0.68522811
tag103396	1.6290503	2.4951031	-1.0	3.7677848
amp786	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
amp785	-1.0	1.1776801	-1.0	0.22875506
tag110926	2.7027984	2.8476224	4.861012	2.1303263
tag100033	1.2982364	1.8008673	1.1191629	2.2031486
tag100034	4.2813978	3.8383806	6.0761991	4.2250414
amp657	0.51996541	4.1657658	7.4216986	3.838763
amp659	-1.0	2.4750841	1.7360989	2.1779623
tag100103	2.6139414	0.72855145	1.8020378	5.1431317
tag100036	4.815362	3.0114238	4.0926218	0.7284286
amp658	3.8403976	5.6846552	2.5488622	3.0113261
tag100201	4.0473475	2.922869	4.1281443	5.1193686
tag100253	0.099529997	0.19035867	1.1831228	0.80902618
amp660	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
tag100537	7.0367689	9.5688009	4.2060709	8.0005379
amp776	-1.0	-1.0	1.7472012	-1.0
amp773	-1.0	0.5471285	-1.0	1.6745132

tag100156	1.6946799	1.4743228	1.359647	2.9226305
tag100208	4.1080027	3.6669466	2.8921361	3.8935091
tag100261	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
tag100536	2.7965903	3.6076233	4.4667506	9.6591377
amp775	-1.0	-1.0	3.6297786	4.6304741
amp768	8.1166782	10.999471	0.56775302	11.560527
amp698	-1.0	3.4407701	-1.0	-1.0
amp693	2.4457047	-1.0	0.75908655	-1.0
amp690	1.1882986	2.7288616	-1.0	-1.0
amp687	0.10192829	4.6117015	3.6956332	-1.0
amp705	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
tag102361	1.4186362	1.2925901	9.1129837	2.0112495
tag103393	2.4349031	2.6634824	3.8472943	3.4212525
tag102360	3.1365232	0.23514952	1.9334131	2.4389431
amp695	5.0711827	3.7318215	-1.0	3.6685567
tag100525	3.4372444	5.0802393	5.0186729	2.5857177
tag101882	3.3556929	1.5362495	4.6817985	3.6501477
amp696	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
amp691	0.19390063	2.0979249	1.8113177	2.0020506
amp688	-1.0	0.21472915	0.90614569	0.24378289
tag103392	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
tag103395	3.5525565	1.5059268	0.77178103	0.10563457
amp701	2.4803984	2.5913918	2.6270554	1.8647524
amp689	-1.0	-1.0	2.0154369	2.6441789
tag111038	4.9048414	4.3392534	3.8039694	1.6507534
amp654	-1.0	-1.0	3.0042706	-1.0
amp653	0.14483526	1.0869892	1.7518144	1.722743
tag100250	5.7233233	8.6282282	3.6080718	7.2412219
tag101374	-1.0	4.311121	6.7530756	0.86324865
tag101878	3.7522552	5.1899581	2.4020441	0.67157382
amp649	0.50855368	2.2462275	3.138818	4.2195201
tag101877	5.9552798	9.9434624	-1.0	4.2651691
amp647	6.8153214	-1.0	-1.0	-1.0
tag111045	2.396462	-1.0	-1.0	5.1980128
amp541	6.8793902	15.335615	-1.0	0.39951494
amp542	0.21506403	5.1993995	0.13696843	-1.0
tag103834	2.55022	1.9039376	0.76332653	-1.0
tag102907	3.9992604	6.3955097	5.4047165	5.9995017
amp544	-1.0	8.4363461	2.8463769	4.439518
amp545	3.0582268	2.9301331	3.3475432	3.1721537
amp546	3.4968877	3.8044283	3.3832109	3.8126316
amp538	-1.0	12.948635	-1.0	3.0206339
amp527	4.0834827	3.8900321	5.4938979	12.45909
amp547	3.0505126	5.3630776	6.7435594	1.9887793
amp539	3.2608812	-1.0	1.7139647	-1.0
tag103835	2.7419441	4.4500012	4.8764057	3.87767
tag101869	4.6299319	5.4767933	1.3400291	6.031918
tag101366	3.6345558	4.3280406	3.4629202	3.441828

tag110857	1.6563731	2.2111874	3.9867039	2.0947223
tag102352	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
tag102905	0.21834746	0.3077679	-1.0	0.71069103
tag102906	2.649699	2.5815907	2.9156764	3.3845406
amp514	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
tag100185	1.3317435	4.1013451	3.1469066	5.8842015
tag100516	3.0046873	4.6843629	5.5563679	6.195281
amp531	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
tag100241	2.7032561	1.3583231	4.982688	3.1460266
tag100935	4.9574628	6.5366454	1.889539	1.8079422
tag100240	3.6553931	1.4643881	5.1967311	4.3034673
tag100186	10.073657	15.155195	0.4921948	13.898117
tag100517	3.7467687	2.270848	2.0424893	1.7787983
tag101363	1.3239744	1.701221	0.83877367	1.860945
amp535	1.3412848	-1.0	7.0545053	-1.0
tag100187	1.9748095	5.7886057	4.7981219	6.2905588
amp540	-1.0	-1.0	0.81115222	-1.0
tag100936	2.4327915	2.924382	4.0245795	6.243432
amp526	0.94225311	2.4215996	3.1903069	2.4079244
tag100139	3.6186104	2.3371902	3.7384958	2.9039323
tag100188	1.2930486	1.4207978	0.67695636	2.494729
amp528	-1.0	6.8949509	-1.0	5.0500059
amp552	-1.0	2.5699933	0.96146256	1.376701
tag101875	2.288094	1.162672	1.9105724	3.4987736
tag102908	3.2822046	3.4186351	0.6293813	3.1959176
tag111029	2.309252	2.9343965	1.8688974	4.4372606
amp523	4.1473598	4.6382451	5.4620128	4.0148191
tag100136	1.5458071	0.36338162	2.1215911	3.2467895
amp524	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
tag100193	1.8068103	0.47227362	-1.0	0.54844928
tag100099	1.4146131	1.0592575	-1.0	2.3924537
amp602	1.4990162	2.2603347	0.78425193	3.0436773
tag100142	5.968153	4.2591896	3.9746225	5.2421479
tag101379	11.110229	13.289408	9.2349854	8.6655998
tag101380	6.0793452	10.774143	4.362699	6.5179377
tag101381	4.0119081	18.580753	3.5845828	6.4979801
amp637	1.6274734	-1.0	7.2979374	-1.0
amp640	0.82369918	-1.0	-1.0	-1.0
amp613	-1.0	-1.0	1.9162719	-1.0
tag100023	1.1502523	0.16874506	2.3226192	1.1569914
tag110695	5.5922756	8.3274174	5.7331076	6.659976
amp625	3.9516168	3.1254005	4.3633738	5.1880298
amp623	0.011531563	5.6206093	5.1442919	6.592669
amp638	3.7046366	1.331018	5.5539236	7.0208716
tag102916	0.082146376	2.1767919	-1.0	0.54982334
amp615	-1.0	3.0148728	0.83932555	-1.0
tag100523	2.0171101	4.0565991	-1.0	3.1220157
tag110607	0.48608652	2.3922338	3.0426564	4.465054

tag101372	2.8095853	1.6553614	2.5778377	2.3058782
amp619	3.7485301	1.5366725	-1.0	1.746617
amp621	1.8472283	3.9947832	2.9710414	2.8347631
amp626	-1.0	-1.0	1.2728218	0.26669416
amp630	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
tag102359	3.1446867	3.4097483	4.6205111	7.6289039
tag100521	4.1719608	2.3625135	5.8142118	-1.0
amp639	4.0304279	-1.0	-1.0	-1.0
tag100029	-1.0	3.008472	2.7118821	0.23256268
amp641	1.2825369	0.42156351	-1.0	6.164412
amp643	-1.0	-1.0	1.6541238	-1.0
amp632	1.2530204	4.3427191	-1.0	0.50444323
tag100247	1.2014681	1.2544098	2.3694205	2.2754691
tag100199	2.8902497	2.0311236	0.67410594	2.0439184
tag110927	1.8213624	2.2215366	3.3710418	2.8774118
tag100941	4.0156093	3.6189075	4.14921	5.4804411
tag101368	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
tag101370	0.93571705	0.090768978	-1.0	1.6360016
tag101876	0.85514265	1.2250412	2.3922396	0.78724307
tag110980	1.5963376	1.1983817	-1.0	-1.0
tag102358	3.9620154	2.7542276	4.5330844	5.1129518
tag102913	4.7827516	5.769496	7.1226788	6.536335
tag102357	3.4098654	1.9104794	3.488512	2.4515209
tag102356	5.2498136	4.7278366	5.4325113	3.055263
tag110747	2.3090792	1.8625298	2.6100481	2.1597972
tag100030	2.3064866	2.590827	4.2366953	2.8671572
tag100252	-1.0	3.6697099	5.2093663	4.7146297
tag110653	1.5254511	4.1863689	5.7105923	3.0519636
tag110956	4.5902915	-1.0	-1.0	2.6174326
tag110659	-1.0	9.4524221	4.576097	2.1391671
amp686	-1.0	2.8673549	2.5011857	-1.0
tag110929	2.9006131	2.5519302	1.7111701	2.3969231
amp581	-1.0	2.8780866	-1.0	-1.0
tag100191	4.8647451	6.0700169	8.7165298	5.4539976
tag100015	1.4897457	1.7698549	2.2490716	1.8440312
tag100005	-1.0	7.1137905	-1.0	5.2120147
tag100006	2.9530604	3.251719	-1.0	4.3298812
tag100009	0.23163874	0.27537903	-1.0	0.02217019
tag100021	2.1446373	1.209826	2.6485987	2.2171378
tag100004	0.8927114	0.68273348	-1.0	0.35065103
tag100008	1.9416718	3.5064368	6.0823941	6.0885167
tag100020	1.2556474	1.3520632	2.337323	1.6933926
tag100019	3.0053649	4.5191555	8.8266935	4.6578565
tag100007	2.8684843	7.6408601	10.115907	7.3545609
tag100012	3.8223219	4.1103549	4.2181177	3.3410096
amp590	1.7391677	1.8753943	-1.0	3.0815825
amp594	-1.0	1.2208723	-1.0	2.0021486
tag100011	2.0562224	2.1947	3.2518766	1.2053175

tag100010	1.1955116	-1.0	-1.0	2.5210226
tag100016	2.7450259	2.664448	4.8553066	2.5880895
tag100190	5.4098244	7.3096824	10.698084	6.5320048
tag100140	1.5357437	2.5414815	1.7135255	2.1156108
tag100141	1.4207458	-1.0	0.3250145	-1.0
tag100018	0.21299344	0.68616164	0.5296551	0.77851689
tag100013	1.7117289	0.58721602	1.0234272	2.04845
amp799	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
tag100209	2.2891228	2.8896642	1.7064266	2.7073355
amp798	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
tag100265	1.1626531	4.1887078	6.222661	3.0967648
tag100002	0.3383365	-1.0	0.47679371	1.0894886
tag100003	2.3821316	1.5543668	3.8180478	4.3470154
amp501	2.6779854	2.6102099	4.4314089	3.785938
tag100932	1.0110316	0.98301983	1.155702	1.0779891
amp508	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
tag100239	8.4482784	6.7246056	7.4589696	10.259717
tag100931	3.3317695	2.976619	-1.0	4.7112117
amp504	12.206912	12.168715	12.179368	15.640723
tag100098	1.7882671	-1.0	2.0170276	1.1907475
tag100115	6.1800966	9.594451	8.3859415	7.1513433
amp753	-1.0	2.2098563	-1.0	-1.0
tag100053	6.0505795	4.4104609	4.4741015	4.2219672
tag100114	3.8332214	1.2946441	3.8836215	3.5258496
tag100052	2.0388157	0.59755343	6.5952029	1.8427449
tag100051	8.8988752	11.46299	21.157406	0.30800349
amp861	0.18909976	2.5509543	1.0369651	1.468172
tag100056	3.9867551	3.3244674	4.9566865	3.5750253
amp860	7.8487358	-1.0	4.1788812	6.6748695
amp863	1.0762515	28.379164	0.4172911	0.87443465
tag101388	3.83867	5.2607164	6.4623303	5.7798491
amp837	0.21982267	0.13176776	1.958859	3.7921784
tag101895	5.2173271	7.6452417	1.1571163	7.6255131
tag101892	5.9895911	3.5821576	3.0607424	3.6960518
tag101893	2.5145977	3.127214	1.769383	2.6935389
tag100539	6.2779517	3.4731169	5.4840574	7.8632321
tag104692	9.3887053	10.152415	2.9285612	10.37822
tag104818	5.6496282	3.2202787	5.0587649	5.1216974
amp844	3.9527364	4.3153472	-1.0	3.2735472
tag104693	7.7644043	5.3938732	4.9132147	2.9302137
amp803	1.613973	3.6415157	-1.0	5.0836101
tag110963	6.2743516	2.7403085	-1.0	-1.0
amp815	4.1796551	3.7879021	3.0092728	4.7270594
amp814	4.1025286	-1.0	-1.0	-1.0
tag102371	2.2715237	2.4656527	3.0818932	4.4680634
tag101391	11.177982	16.775719	4.6410828	13.914928
amp806	3.2321513	5.7856674	4.236351	3.2510374
amp828	4.1983314	3.4152589	5.8522096	4.6311355

tag100266	4.5765944	5.2682443	0.70807135	4.4144769
amp810	7.0385723	1.7964718	-1.0	-1.0
amp836	0.97722471	3.2154267	0.84503305	2.5750287
amp835	2.327548	4.7700853	-1.0	1.3839487
tag102923	7.3619432	5.2005992	2.5600033	4.8895268
tag100267	4.7425146	1.7659824	5.9213209	6.6655512
tag101890	8.2186365	6.0418129	3.7275736	7.6975784
tag100540	6.0470204	9.0957823	0.20199156	7.4432244
amp838	3.284327	19.313326	-1.0	6.7416968
amp839	-1.0	-1.0	2.2258396	4.5127497
tag110875	4.9055228	1.5967996	-1.0	1.223527
tag100957	4.9932947	3.3706989	6.6512527	0.16245227
tag101393	5.7246895	6.8594012	5.8551421	4.8145204
tag100542	9.0803185	7.8464828	8.7181501	4.7567997
amp807	4.816524	13.704489	11.628378	5.5019631
amp833	-1.0	-1.0	-1.0	0.97267723
tag101392	3.586293	0.42101896	4.5495157	5.5401487
tag101891	5.6176987	7.9137998	-1.0	6.7910557
tag103839	7.9739084	6.1427927	7.6627884	7.3395553
tag104229	4.6508536	4.9625807	2.8655429	4.9167995
amp834	-1.0	-1.0	9.5298119	-1.0
amp808	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
tag104819	0.49020663	1.0641698	-1.0	1.7703191
tag104821	1.0470986	1.0950314	1.446828	1.0125182
tag103841	3.5070531	3.7739718	4.5068994	4.619235
amp800	3.816103	5.8192167	4.8800759	5.2536316
tag111023	6.8050981	7.8914495	9.0598259	4.6123962
tag110880	6.0147581	7.5673985	-1.0	8.6588736
tag110881	1.2342246	-1.0	-1.0	-1.0
tag110882	5.7857804	9.2213497	4.5091543	3.0363917
tag110800	0.83803833	4.5635982	-1.0	6.3565249
tag110681	8.3483315	4.836112	7.5902162	6.3645191
tag110728	-1.0	7.3333611	0.62955451	-1.0
tag100041	1.1427735	1.2792161	2.5278351	2.1600988
tag100043	2.3224895	3.0061436	2.3193045	6.3636413
tag100042	0.99343824	1.7612363	2.2766242	3.1319346
tag100039	4.0865541	4.0209808	4.7709494	6.5383072
tag100040	0.64133716	3.7470844	5.045301	4.693758
amp679	6.0406032	4.3874216	4.847971	2.291028
tag100038	4.2826867	7.4213438	6.9243636	9.7063446
tag100127	4.4447794	2.5887558	0.62400228	2.6657155
amp943	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
tag110945	2.0511022	2.2323954	1.732111	2.1717517
tag110885	0.37593707	0.98181307	0.93152112	2.6025014
tag110640	-1.0	0.26615152	0.82751161	0.64702117
tag110776	3.6716416	2.2002177	0.71911854	4.2617269
tag110755	-1.0	6.6108384	1.376102	1.9229527
tag100086	1.1329031	-1.0	-1.0	-1.0

tag100046	1.2535816	4.8108983	7.2509985	5.4657817
tag100044	10.811992	3.342823	20.180695	9.5618382
amp718	4.0528774	-1.0	-1.0	3.203716
tag110556	-1.0	2.5221877	-1.0	1.4035504
tag110559	-1.0	1.8820713	-1.0	-1.0
tag110939	3.1166046	3.3842905	1.1405059	0.33856678
amp558	2.2232351	0.81359965	1.1805286	3.5102947
tag111024	1.9401561	2.4169104	-1.0	0.74662018
amp557	2.2064955	2.5322068	3.1269369	1.9670857
tag110600	1.1978571	0.39477766	5.6318154	2.6399846
tag110877	2.7681978	7.0119982	-1.0	5.4044309
tag110796	1.183602	4.5587158	2.5455868	1.1411361
amp559	-1.0	0.95654786	3.1675062	5.1036477
tag110994	4.1678772	3.4894631	2.9038458	1.4267812
tag110942	-1.0	-1.0	5.8977313	5.8827281
amp560	1.6099049	4.0586977	7.1071382	0.032016981
amp561	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
amp562	-1.0	4.6290483	3.0190291	-1.0
tag110995	0.46986869	5.1789341	-1.0	4.3840289
tag110878	0.76087421	3.8086128	2.5267026	4.8693733
tag110799	3.0143268	1.8443608	5.319056	3.8808548
tag110879	5.0868039	11.394435	7.0315576	10.561402
amp708	-1.0	-1.0	1.7506852	-1.0
tag100204	4.1912932	6.8515077	1.7886328	8.4905157
tag100154	5.8598995	6.0760899	1.6073655	7.5892248
amp715	8.4653759	9.39291	14.435107	0.2021064
amp709	2.5708971	-1.0	-1.0	0.46460411
amp712	3.1482871	3.9378211	2.251389	5.2750626
tag100106	2.0763445	0.053069931	0.25576732	-1.0
tag100152	4.5467324	5.0279102	4.8103886	4.1520524
tag100153	-1.0	-1.0	7.743804	-1.0
amp849	4.0000615	2.3982854	2.4293981	2.3624213
amp846	2.7428596	1.9980229	3.7671511	3.7313683
amp845	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
tag101396	2.9892204	5.8623343	3.5918603	7.1727109
tag100118	6.2668552	8.3912859	6.5238733	7.5313096
tag100158	3.1183329	-1.0	3.6353574	1.636174
amp678	-1.0	1.0964133	-1.0	-1.0
tag100150	4.2171078	4.6315088	3.9305677	5.786479
tag100948	1.3811764	1.3090899	4.1583219	3.5111737
tag101375	7.8998733	6.4126415	3.8403051	0.65960544
tag101879	3.8428545	2.7995455	4.1129847	3.0501354
amp674	-1.0	-1.0	2.0248218	0.89983338
tag111019	1.2547346	-1.0	0.45327356	-1.0
tag110830	0.16803387	-1.0	-1.0	0.15122327
tag110870	1.6111081	5.0487971	3.1481924	-1.0
tag110933	-1.0	5.1689649	8.3979425	6.154789
tag110901	4.1522031	9.2744923	-1.0	8.3246937

tag111033	4.8159943	3.9114017	3.7748053	7.2073131
tag110902	3.3670585	2.723928	3.008358	5.3947144
tag110598	10.805107	10.242161	2.7483714	12.683793
tag110609	-1.0	2.7194493	3.860399	0.65190262
tag110626	2.5428014	1.6497654	2.9774606	3.3341763
tag110959	-1.0	10.159115	14.651917	11.156391
tag110592	2.6879289	1.2392507	2.5280139	0.018753842
tag111014	3.6016223	9.9375	3.1841011	4.9018173
tag110985	6.933641	0.57287472	-1.0	4.9078822
tag110606	1.4314215	6.652616	6.0841994	6.2951789
tag110645	5.6876416	-1.0	2.1910319	1.303641
tag110593	2.1478226	6.2456193	7.5950751	7.4034481
tag110986	-1.0	5.2309518	6.417531	2.6634381
tag110934	2.1181235	8.5939217	4.1031675	0.86738658
tag110743	4.1406803	3.4056935	6.1307111	3.996191
amp853	2.9886854	2.3103228	4.6616693	-1.0
tag110960	2.8591058	2.7502103	0.16446117	4.3687701
tag110831	0.3293134	6.6232886	5.629643	12.371955
amp854	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
amp855	-1.0	6.1359415	3.5826154	5.2610106
tag110637	-1.0	3.5078981	8.0180254	-1.0
amp851	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
tag110620	1.1571538	3.9821332	-1.0	9.4375782
tag111020	4.4901438	3.6112013	2.5587659	6.3619204
amp856	1.5634054	6.2511315	5.8093634	3.9290056
tag104842	-1.0	-1.0	-1.0	2.2931967
tag104230	0.92421442	2.0150666	2.5146451	2.117538
tag101897	-1.0	0.2828919	3.5485628	2.3073046
amp859	0.68801588	6.7851896	6.7133331	9.6190376
tag110904	7.867053	7.9489975	8.5878305	12.012525
tag110784	-1.0	4.013752	5.4545093	5.4177403
tag110649	11.201917	13.032303	5.5824814	12.015815
tag111042	9.1658831	10.596729	-1.0	13.489717
tag110625	4.8609915	4.0306535	3.774087	3.2172129
tag110871	7.4302096	9.0563622	-1.0	10.662297
tag110872	-1.0	14.410912	12.722295	7.8245034
amp918	0.57215446	12.56707	8.2162628	6.2711711
tag100960	-1.0	4.8365779	2.8674498	3.0705907
tag101398	1.1538335	2.9937618	2.3411024	2.6565018
tag100545	3.3963213	3.9102638	1.0826309	3.6389647
tag100273	-1.0	1.0730473	-1.0	1.1820229
amp575	-1.0	8.4864397	-1.0	3.1575222
amp576	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
tag100124	4.6690612	4.5891628	7.055418	5.8290668
tag100067	5.6720743	10.180836	11.376378	7.7390614
tag110908	-1.0	4.6277184	3.7990813	6.2249703
tag110798	0.52675718	6.7346411	0.14673744	3.4805758
tag100123	1.4044298	0.90023166	0.04221807	3.1412628

tag100066	4.248929	3.1944499	4.56564	4.4834361
tag100122	2.9213793	5.4176669	8.3620996	5.0256343
tag100169	-1.0	3.6189995	7.2830973	7.6075969
tag100168	0.43075839	1.7194084	-1.0	0.39012143
tag100544	4.1062474	5.6293912	5.8798137	5.3034511
tag110665	1.0355332	4.4994521	4.1817045	3.3880868
amp906	6.1178908	3.5928776	1.5832576	2.8855774
amp904	2.2423937	3.3688345	2.0112553	1.3139342
amp905	3.2289357	1.9620948	1.3387623	1.3975544
amp894	-1.0	1.6580788	-1.0	0.27384466
tag100959	4.9815731	3.8693662	0.40086558	5.2422695
tag100120	3.461297	5.6297154	3.7547016	5.02283
amp913	5.0176845	2.4824092	3.927141	5.9053087
tag101899	0.5808726	2.7105217	2.7651699	0.20738657
tag100272	2.4448245	4.1696272	6.5018291	5.4076343
tag100165	7.4262443	7.9942975	5.1129861	5.8320007
tag100069	3.1567585	2.7140312	3.0641873	2.5535314
tag100070	3.3642783	2.641923	3.7286625	3.6136689
amp890	2.7410109	3.4028606	3.9720366	1.741888
amp901	4.0594683	4.3765812	2.4448669	5.2955904
tag100076	3.6559293	1.3636528	4.8111734	5.0878849
amp888	2.8108935	-1.0	-1.0	1.1494712
amp900	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
tag100075	2.0949857	1.5506772	3.0953913	0.48994318
amp889	-1.0	-1.0	10.8249	0.2931025
tag100166	7.9460382	1.7534473	2.759881	7.9955525
tag100164	0.91955572	0.21919431	6.4496436	0.30897111
tag110632	-1.0	6.043571	-1.0	2.9957459
tag110809	1.7987372	6.699975	4.6381278	0.5478251
tag110983	1.8923535	5.7195621	-1.0	3.1675777
tag111040	1.088306	2.2286518	-1.0	-1.0
tag110782	6.2180924	4.4494405	0.73040265	1.3716114
tag110883	6.2241426	4.324451	4.7192526	2.6835914
tag110730	4.6196046	11.901588	5.3255477	12.023381
tag110724	4.7334743	19.152634	9.8961411	9.8484945
tag110686	4.3620949	16.298796	1.0498688	8.4294605
tag110848	2.523139	1.1436357	6.0622554	0.75196725
tag110708	5.2260284	19.305214	-1.0	7.3749599
tag110802	2.0901594	2.4656746	1.661424	1.8950512
tag110944	3.9952362	3.9690356	0.62144852	0.22627632
tag100249	4.7418022	4.1815057	6.1185303	5.156971
amp644	9.8563499	12.453215	6.2932916	5.0125136
amp646	5.7334862	3.7481174	-1.0	0.92754215
tag110749	2.3284802	3.4192643	2.9823449	4.0983052
tag110751	4.0067396	4.8707967	7.2206306	-1.0
tag110931	3.59233	4.2243147	2.7636936	-1.0
tag110783	2.7284782	1.642206	1.4368649	1.9537317
tag110900	13.528924	13.283318	-1.0	0.85309803

tag110588	2.1375146	1.859238	2.1734502	3.2509398
tag110932	2.7396312	6.2776871	1.8023182	7.3353281
tag111031	3.8127255	2.0896764	6.279201	6.4503789
tag110958	1.1250594	4.0261655	0.89551419	7.141212
tag110984	4.8654151	5.6473522	5.4430938	6.6511965
tag110753	-1.0	3.6466784	4.8444657	0.10390439
amp870	1.1041347	1.2209883	-1.0	2.4110897
tag110884	1.3881317	2.4589133	6.6184711	3.3447163
tag110850	1.9059845	1.7593825	1.3798389	1.1205254
tag110804	0.080659717	5.3876657	3.7683775	3.3504064
tag110852	3.5984054	3.0999043	3.4342017	3.1201849
amp871	4.4232526	1.8999903	3.727443	-1.0
tag110853	2.4550812	1.3724117	0.30851042	1.4432389
tag110849	-1.0	3.2225525	3.2200499	6.7039127
tag110805	6.6855659	6.5328431	1.0676578	0.47039035
tag110762	4.1211457	16.210037	10.707551	6.487329
amp885	0.37943235	-1.0	8.4306345	0.10799982
amp884	0.69212902	-1.0	6.8543348	-1.0
amp882	-1.0	1.7370569	7.9935069	1.4104029
tag100064	0.69333029	1.8636842	0.13290907	1.5123866
tag110707	6.3739386	18.516918	11.537224	3.6564898
amp881	0.35372543	-1.0	8.2788544	-1.0
tag100213	6.4197454	5.0778594	2.1118488	4.1316586
tag100211	0.089172021	2.0434077	1.8225203	1.9695089
tag100212	2.9245429	5.3798356	5.1181078	4.4657698
amp868	7.9719615	15.118157	8.1100492	4.3597007
tag100159	1.7635694	1.4945331	3.8001251	2.1603661
tag100057	2.5901344	5.8913918	-1.0	6.1711473
tag101397	0.40120849	-1.0	0.6196627	-1.0
tag100271	3.0957036	9.6250029	8.8381319	7.9949389
amp874	3.8784666	3.9466274	2.5790396	2.0485017
amp875	2.7376583	9.3502445	3.534363	-1.0
amp873	5.7125163	-1.0	4.9056149	4.903441
amp878	0.21383396	-1.0	4.5124397	3.8173571
amp872	2.0166063	1.3157719	3.7062922	2.9616647
amp876	-1.0	-1.0	1.7946529	-1.0
tag100207	3.2184899	1.9729131	3.4280086	3.2246654
amp732	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
amp733	-1.0	3.4993668	4.8284397	2.6528695
tag100049	6.3220868	8.4295807	6.8795328	9.126462
tag100050	1.7611485	6.5890408	4.5821958	6.7348537
tag100951	4.6801887	3.7732131	-1.0	0.41143984
amp748	2.1276748	3.3374593	-1.0	4.3777266
tag100530	2.0182121	6.2355156	-1.0	8.0672474
tag101378	4.6961761	3.5791886	-1.0	-1.0
tag100206	2.9891243	1.9151031	4.2593565	4.00314
amp737	0.55827647	-1.0	1.6816338	0.86957073
tag100112	0.68054056	1.3968507	-1.0	2.2511213

amp738	4.3059773	16.361784	1.3317742	10.327072
tag100110	2.2838862	1.9341257	3.291693	4.5615616
tag100111	2.7258012	3.2781615	2.4012265	3.4061589
amp731	1.8504249	4.1237454	4.0757775	1.8108997
tag100048	6.5683146	9.7045498	6.6770101	10.950913
tag100113	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
amp675	3.6640022	1.7551972	2.889276	3.1586518
tag100255	3.4568496	6.3149214	6.2690678	6.4402103
tag110633	0.81764984	1.4689652	3.2613044	1.6614983
tag110610	11.274024	13.589069	-1.0	-1.0

Article 1 : Genomics of Clear-cell Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-analysis

European Urology, 2022 April ;81(4):349-361. Thi Oanh Bui, Van Tu Dao, Van Tai Nguyen, Jean-Paul Feugeas, Frédéric Pamoukdjian, Guilhem Bousquet

Article 2 : Metastatic clear-cell renal cell carcinoma: a frequent NOTCH1 mutation predictive of response to anti-NOTCH1 CB-103 treatment

Experimental Hematology & Oncology. 2023 May 15;12(1):46. Thi Oanh Bui, Eurydice Angeli, Morad El Bouchtaoui, Guillaume Gapihan, Van Tu Dao, Justine Paris, Christophe Leboeuf, Michael Soussan, Patrick Villarese, Marianne Ziol, Emmanuel Van Glabeke, Thi Huong Le, Jean-Paul Feugeas , Anne Janin, Guilhem Bousquet

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)  
 journal homepage: [www.europeanurology.com](http://www.europeanurology.com)



## Platinum Priority – Review – Kidney Cancer

Editorial by Kathryn H. Gessner, William Y. Kim and Ibardo A. Zambrano on pp. 362–363 of this issue

# Genomics of Clear-cell Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-analysis

Thi Oanh Bui <sup>a,b</sup>, Van Tu Dao <sup>a,b</sup>, Van Tai Nguyen <sup>a,b,c</sup>, Jean-Paul Feugeas <sup>d,e</sup>, Frédéric Pamoukdjian <sup>b,f,g</sup>, Guilhem Bousquet <sup>b,c,d,f,\*</sup>

<sup>a</sup> National Cancer Hospital, Cancer Research and Clinical Trials Center, Ha Noi, Vietnam; <sup>b</sup> Université de Paris, INSERM, UMR\_S942 MASCOT, F-75006, Paris, France; <sup>c</sup> Service d'Oncologie Médicale, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Avicenne, Bobigny, France; <sup>d</sup> UMR-S1098, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Besançon, France; <sup>e</sup> Université de Franche-Comté, Besançon, France; <sup>f</sup> Université Sorbonne Paris Nord, Villejuif, France; <sup>g</sup> Service de Médecine Gériatrique, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Avicenne, Bobigny, France

## Article info

### Article history:

Accepted December 2, 2021

### Associate Editor:

James Catto

### Statistical Editor:

Rodney Dunn

### Keywords:

Renal cell carcinoma  
 Genomics  
 Mutation  
 Primary tumor  
 Metastases

## Abstract

**Context:** Although antiangiogenic treatments and immunotherapies have significantly improved the prognosis of metastatic renal cell carcinoma (RCC), many patients will develop resistance, leading to treatment failure. Genetic tumor heterogeneity is a major cause of this resistance.

**Objective:** To perform a meta-analysis of genomic data for clear-cell RCC obtained from primary tumors and metastases to assess the prevalence of gene mutations and copy number alterations (CNAs).

**Evidence acquisition:** Articles were selected from Medline and Embase libraries using the search algorithm ("Kidney Neoplasms"[Mesh] OR "Renal Cell Carcinoma") AND ("Genomics"[Mesh] OR "Mutation") from January 1999 to February 2021. A critical review was conducted according to the Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis (PRISMA) statement. Ninety-three publications were selected for inclusion in this meta-analysis.

**Evidence synthesis:** Our meta-analysis included a total 14 696 patients, 14 299 primary tumor samples, and 969 metastatic samples. We evaluated the overall and subgroup prevalence of gene mutations and CNAs, including comparisons between primary tumors and metastases. In particular, for metastases we observed that the mutation prevalence was significantly more marked for ten genes compared to primary tumors, with no or little heterogeneity across studies. The *VHL* mutation prevalence increased significantly from 64% in primary tumors to 75% in metastases ( $p < 0.001$ ). There was a significant increase in CNA prevalence from primary tumors to metastases for chromosomes 1p36.11, 9p21.3, and 18 in terms of losses, and for chromosomes 1q21.3, 7q36.3, 8q, and 20q11.21 in terms of gains. *CDKN2A*, also called *p16* and involved in cell-cycle progression, is located at the 9p21.3 locus and was lost in 76% of metastatic samples. *ASXL1*, located on 20p11.21 and amplified in 50% of metastatic RCCs compared to 21% of primary tumors ( $p < 0.001$ ), is closely linked to *BAP1* function.

\* Corresponding author. Inserm UMR-S942, Université de Paris-Université Sorbonne Paris Nord, 1 rue Chablis, 93000 Bobigny, France.

E-mail address: [guilhem.bousquet@aphp.fr](mailto:guilhem.bousquet@aphp.fr) (G. Bousquet).



**Conclusions:** Our results underline the added value of preferential biopsies on RCC metastases to fully explore the biology of metastatic disease for therapeutic purposes.

**Patient summary:** We reviewed the literature on genetic mutations in primary tumors and metastatic lesions in kidney cancer. Our pooled results for all the relevant studies show a higher level of mutations in metastases than in primary tumors. This highlights the importance of taking biopsies of metastases to analyze genetic mutations and potentially guide selection of the most suitable treatment strategy.

© 2021 European Association of Urology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Although renal cell carcinoma (RCC) accounts for only 2% of all cancers diagnosed, its incidence has been rising for 20 yr, and 30–50% of diagnoses are incidental [1–3]. In addition, 60% of patients are diagnosed at the metastatic stage or develop metastases in the course of their disease [4,5]. Over the past 15 yr, antiangiogenic treatments, and more recently immunotherapies, have significantly improved the prognosis of metastatic RCC [6]. However, acquired resistance occurs almost constantly [7], challenging daily practice in oncology.

Differential responses to drugs are closely linked to the tumor genotype. In the past decades, research on human cancer genetics has considerably benefited from new technologies, including whole-genome sequencing, which has led to better knowledge of carcinogenesis and is useful for diagnostic and therapeutic purposes. This is particularly true for RCC. In addition, multiple sampling approaches have contributed to elucidation of the heterogeneity of primary RCCs [8]. Radiology-guided biopsies of metastases have contributed to the sequencing of metastatic samples and thus helped in exploring the biology of metastatic disease, including clonal expansion of minority clones from a primary tumor.

Here we report the first meta-analysis of RCC genomic data obtained from primary tumors and metastases to assess the prevalence of gene mutations and copy number alterations (CNAs).

## 2. Evidence acquisition

We conducted this systematic review according to the methods outlined in the Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses (PRISMA) [9] guidelines.

### 2.1. Eligibility criteria

Our objective was to perform a meta-analysis on genomic data obtained from RCCs, including primary tumors and metastases, to assess the prevalence of gene mutations and CNAs. The inclusion and exclusion criteria are described in the [Supplementary material](#). The PRISMA flow diagram for the study is presented in [Figure 1](#).

### 2.2. Search strategy

Articles were selected from the Medline and Embase libraries using the search algorithm (“Kidney Neoplasms”[Mesh] OR “Renal Cell Carcinoma”) AND (“Geno-

mics”[Mesh] OR “Mutation”) from January 1999 to February 2021. We manually searched the reference lists of all articles included to identify any potentially related articles. Zotero software was used to manage the references and remove any duplicate articles. In addition, the references contained in the articles searched and relevant articles were also considered to avoid eligible articles being missed.

### 2.3. Study selection

Two authors (T.O.B. and G.B.) independently screened the papers retrieved, initially by title, then by abstract and finally by full text. A total of 93 relevant publications were identified ([Supplementary Table 1](#)).

### 2.4. Protocol and registration

We registered the review in PROSPERO, an international prospective register of systematic reviews. The protocol can be accessed at <https://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/> (registration number CRD42021245173).

### 2.5. Quality assessment

To assess quality, we used the Q-genie tool [10] ([Supplementary material](#)).

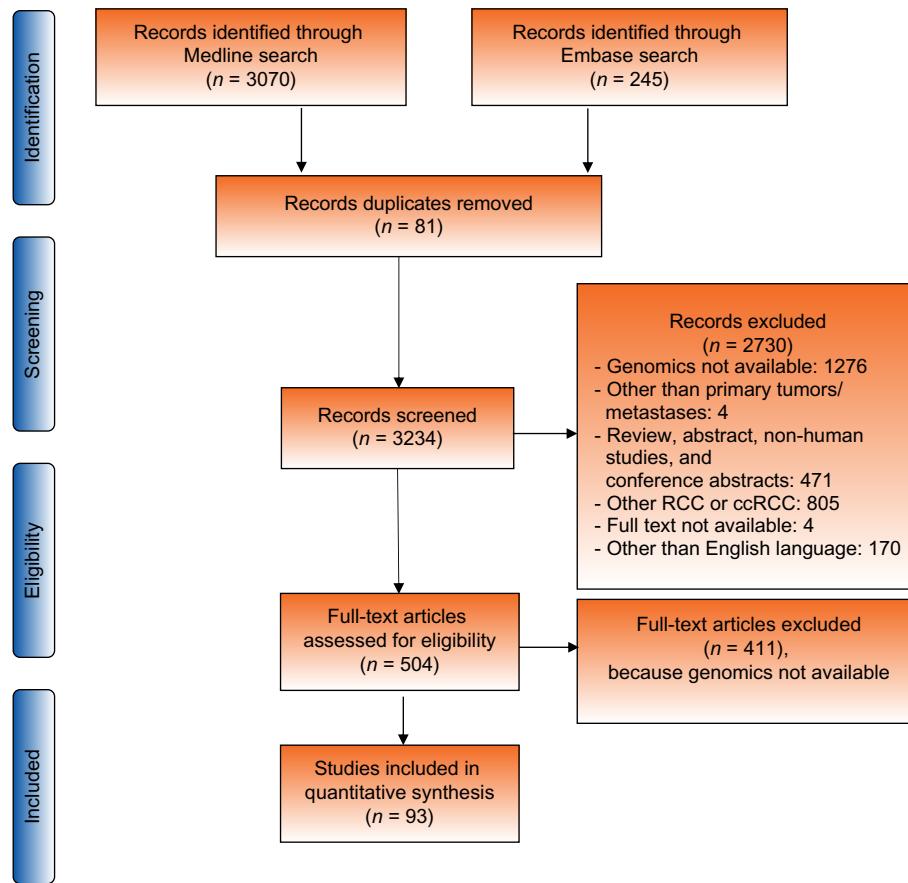
### 2.6. Statistical analysis

The data analysis was performed by two authors (T.O.B. and F.P.) using R Studio version 1.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) with the *Meta* package ([Supplementary material](#)). Sensitivity analyses were conducted using the following parameters: gene analysis method (target NGS or Sanger sequencing by reference for NGS), tumor preservation conditions (frozen vs formalin-fixed), and sample number (single vs multiple samples).

## 3. Evidence synthesis

### 3.1. Study selection

After the literature search and removal of duplicate articles, 3234 records were identified. After a careful selection according to titles and abstracts, 2730 records were excluded, and the remaining 504 articles were retrieved for full-text screening. Of these, 411 papers were then excluded because genomic data were not available. A total of 93 articles were finally included in this meta-analysis ([Fig. 1](#)).



**Fig. 1 – Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis (PRISMA) flow diagram for study screening and selection.** After the literature search and removal of duplicate articles, 3234 records were identified. After careful selection according to titles and abstracts, 2730 records were excluded, and the remaining 504 articles were retrieved for full-text screening. Of these, 411 papers were then excluded, mainly because the genomic data were not available. A total of 93 articles were finally included in this meta-analysis. RCC = renal cell carcinoma; ccRCC = clear cell RCC.

### 3.2. Study characteristics and quality assessment

The characteristics of the 93 studies selected are summarized in [Supplementary Table 1](#). Overall, our meta-analysis included a total 14 696 patients (median age 61 yr and male/female ratio of 1.96) with 14 299 primary tumor samples and 969 metastatic samples. A total of 79 studies concerned single-sample genomic analyses, whereas 14 studies conducted multiple-sample genomic analyses.

The quality assessment revealed that 42 studies (45.2%) were of good quality, 45 (48.4%) were of moderate quality, and six (6.4%) were of low quality ([Supplementary Table 2](#)).

### 3.3. Gene mutation profile of primary RCCs

A total of 57 studies provided data on gene mutations. Using a mutation prevalence threshold of 1% chosen a priori, the final analysis was carried out on the 51 most frequently mutated genes.

For primary RCCs (total of 10 874 samples) the gene mutation prevalence ranged from 1% to 64%, and most studies were heterogeneous for this analysis ([Fig. 2](#) for *VHL*). The four most frequently studied genes were *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, and *BAP1*, for which the mutation prevalence was 64%, 36%, 20%, and 13%, respectively ([Table 1](#)). Notably, the mutation prevalence was also high (>10%) for *ABCB1*,

*TTN*, *MUC4*, *CDK12*, *DNMT3A*, *UGT1A1*, and *ERBB3*, but with only one to three studies included.

We then focused on *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, and *BAP1* for subgroup analyses using the following parameters: Q-genie quality score (good vs others), gene analysis method (NGS vs target NGS vs Sanger sequencing), tumor preservation conditions (frozen vs formalin-fixed), and sample number (single vs multiple samples).

When we compared studies with good quality scores to the other studies, there was a higher mutation prevalence only for *SETD2* (23% vs 13%,  $p = 0.022$ ; [Table 2](#)).

NGS was the main method used (67.5% of the samples). For the *VHL* and *SETD2* genes, NGS yielded a significantly higher mutation prevalence than Sanger sequencing. Typically, for the *VHL* gene the mutation prevalence was 71% using NGS, compared to 52% using Sanger sequencing ( $p = 0.003$ ; [Table 2](#)).

Surprisingly, mutation prevalence was not significantly different between frozen samples and formalin-fixed samples.

By contrast, multiple sampling significantly increased the values found for mutation prevalence for *VHL*, *PBRM1*, *BAP1*, and *SETD2*, with odds ratios (ORs) ranging from 1.38 to 3.6 ([Table 2](#)). For *VHL*, the mutation prevalence reached almost 100%, rising from 58% with single-sample analysis

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)  
 journal homepage: [www.europeanurology.com](http://www.europeanurology.com)



## Platinum Priority – Review – Kidney Cancer

Editorial by Kathryn H. Gessner, William Y. Kim and Ibardo A. Zambrano on pp. 362–363 of this issue

# Genomics of Clear-cell Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-analysis

Thi Oanh Bui <sup>a,b</sup>, Van Tu Dao <sup>a,b</sup>, Van Tai Nguyen <sup>a,b,c</sup>, Jean-Paul Feugeas <sup>d,e</sup>, Frédéric Pamoukdjian <sup>b,f,g</sup>, Guilhem Bousquet <sup>b,c,d,f,\*</sup>

<sup>a</sup> National Cancer Hospital, Cancer Research and Clinical Trials Center, Ha Noi, Vietnam; <sup>b</sup> Université de Paris, INSERM, UMR\_S942 MASCOT, F-75006, Paris, France; <sup>c</sup> Service d'Oncologie Médicale, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Avicenne, Bobigny, France; <sup>d</sup> UMR-S1098, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Besançon, France; <sup>e</sup> Université de Franche-Comté, Besançon, France; <sup>f</sup> Université Sorbonne Paris Nord, Villejuif, France; <sup>g</sup> Service de Médecine Gériatrique, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Avicenne, Bobigny, France

## Article info

### Article history:

Accepted December 2, 2021

### Associate Editor:

James Catto

### Statistical Editor:

Rodney Dunn

### Keywords:

Renal cell carcinoma  
 Genomics  
 Mutation  
 Primary tumor  
 Metastases

## Abstract

**Context:** Although antiangiogenic treatments and immunotherapies have significantly improved the prognosis of metastatic renal cell carcinoma (RCC), many patients will develop resistance, leading to treatment failure. Genetic tumor heterogeneity is a major cause of this resistance.

**Objective:** To perform a meta-analysis of genomic data for clear-cell RCC obtained from primary tumors and metastases to assess the prevalence of gene mutations and copy number alterations (CNAs).

**Evidence acquisition:** Articles were selected from Medline and Embase libraries using the search algorithm ("Kidney Neoplasms"[Mesh] OR "Renal Cell Carcinoma") AND ("Genomics"[Mesh] OR "Mutation") from January 1999 to February 2021. A critical review was conducted according to the Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis (PRISMA) statement. Ninety-three publications were selected for inclusion in this meta-analysis.

**Evidence synthesis:** Our meta-analysis included a total 14 696 patients, 14 299 primary tumor samples, and 969 metastatic samples. We evaluated the overall and subgroup prevalence of gene mutations and CNAs, including comparisons between primary tumors and metastases. In particular, for metastases we observed that the mutation prevalence was significantly more marked for ten genes compared to primary tumors, with no or little heterogeneity across studies. The VHL mutation prevalence increased significantly from 64% in primary tumors to 75% in metastases ( $p < 0.001$ ). There was a significant increase in CNA prevalence from primary tumors to metastases for chromosomes 1p36.11, 9p21.3, and 18 in terms of losses, and for chromosomes 1q21.3, 7q36.3, 8q, and 20q11.21 in terms of gains. CDKN2A, also called p16 and involved in cell-cycle progression, is located at the 9p21.3 locus and was lost in 76% of metastatic samples. ASXL1, located on 20p11.21 and amplified in 50% of metastatic RCCs compared to 21% of primary tumors ( $p < 0.001$ ), is closely linked to BAP1 function.

\* Corresponding author. Inserm UMR-S942, Université de Paris-Université Sorbonne Paris Nord, 1 rue Chablis, 93000 Bobigny, France.

E-mail address: [guilhem.bousquet@aphp.fr](mailto:guilhem.bousquet@aphp.fr) (G. Bousquet).



**Conclusions:** Our results underline the added value of preferential biopsies on RCC metastases to fully explore the biology of metastatic disease for therapeutic purposes.

**Patient summary:** We reviewed the literature on genetic mutations in primary tumors and metastatic lesions in kidney cancer. Our pooled results for all the relevant studies show a higher level of mutations in metastases than in primary tumors. This highlights the importance of taking biopsies of metastases to analyze genetic mutations and potentially guide selection of the most suitable treatment strategy.

© 2021 European Association of Urology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Although renal cell carcinoma (RCC) accounts for only 2% of all cancers diagnosed, its incidence has been rising for 20 yr, and 30–50% of diagnoses are incidental [1–3]. In addition, 60% of patients are diagnosed at the metastatic stage or develop metastases in the course of their disease [4,5]. Over the past 15 yr, antiangiogenic treatments, and more recently immunotherapies, have significantly improved the prognosis of metastatic RCC [6]. However, acquired resistance occurs almost constantly [7], challenging daily practice in oncology.

Differential responses to drugs are closely linked to the tumor genotype. In the past decades, research on human cancer genetics has considerably benefited from new technologies, including whole-genome sequencing, which has led to better knowledge of carcinogenesis and is useful for diagnostic and therapeutic purposes. This is particularly true for RCC. In addition, multiple sampling approaches have contributed to elucidation of the heterogeneity of primary RCCs [8]. Radiology-guided biopsies of metastases have contributed to the sequencing of metastatic samples and thus helped in exploring the biology of metastatic disease, including clonal expansion of minority clones from a primary tumor.

Here we report the first meta-analysis of RCC genomic data obtained from primary tumors and metastases to assess the prevalence of gene mutations and copy number alterations (CNAs).

## 2. Evidence acquisition

We conducted this systematic review according to the methods outlined in the Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses (PRISMA) [9] guidelines.

### 2.1. Eligibility criteria

Our objective was to perform a meta-analysis on genomic data obtained from RCCs, including primary tumors and metastases, to assess the prevalence of gene mutations and CNAs. The inclusion and exclusion criteria are described in the [Supplementary material](#). The PRISMA flow diagram for the study is presented in [Figure 1](#).

### 2.2. Search strategy

Articles were selected from the Medline and Embase libraries using the search algorithm (“Kidney Neoplasms”[Mesh] OR “Renal Cell Carcinoma”) AND (“Geno-

mics”[Mesh] OR “Mutation”) from January 1999 to February 2021. We manually searched the reference lists of all articles included to identify any potentially related articles. Zotero software was used to manage the references and remove any duplicate articles. In addition, the references contained in the articles searched and relevant articles were also considered to avoid eligible articles being missed.

### 2.3. Study selection

Two authors (T.O.B. and G.B.) independently screened the papers retrieved, initially by title, then by abstract and finally by full text. A total of 93 relevant publications were identified ([Supplementary Table 1](#)).

### 2.4. Protocol and registration

We registered the review in PROSPERO, an international prospective register of systematic reviews. The protocol can be accessed at <https://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/> (registration number CRD42021245173).

### 2.5. Quality assessment

To assess quality, we used the Q-genie tool [10] ([Supplementary material](#)).

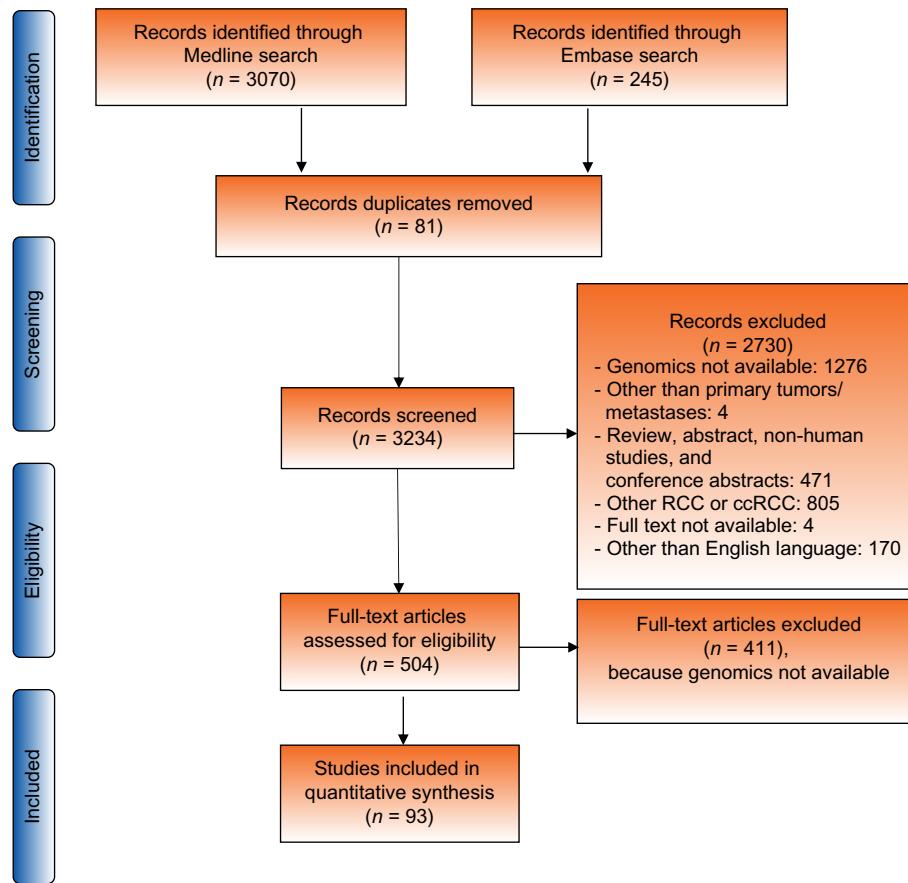
### 2.6. Statistical analysis

The data analysis was performed by two authors (T.O.B. and F.P.) using R Studio version 1.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) with the *Meta* package ([Supplementary material](#)). Sensitivity analyses were conducted using the following parameters: gene analysis method (target NGS or Sanger sequencing by reference for NGS), tumor preservation conditions (frozen vs formalin-fixed), and sample number (single vs multiple samples).

## 3. Evidence synthesis

### 3.1. Study selection

After the literature search and removal of duplicate articles, 3234 records were identified. After a careful selection according to titles and abstracts, 2730 records were excluded, and the remaining 504 articles were retrieved for full-text screening. Of these, 411 papers were then excluded because genomic data were not available. A total of 93 articles were finally included in this meta-analysis ([Fig. 1](#)).



**Fig. 1 – Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis (PRISMA) flow diagram for study screening and selection.** After the literature search and removal of duplicate articles, 3234 records were identified. After careful selection according to titles and abstracts, 2730 records were excluded, and the remaining 504 articles were retrieved for full-text screening. Of these, 411 papers were then excluded, mainly because the genomic data were not available. A total of 93 articles were finally included in this meta-analysis. RCC = renal cell carcinoma; ccRCC = clear cell RCC.

### 3.2. Study characteristics and quality assessment

The characteristics of the 93 studies selected are summarized in [Supplementary Table 1](#). Overall, our meta-analysis included a total 14 696 patients (median age 61 yr and male/female ratio of 1.96) with 14 299 primary tumor samples and 969 metastatic samples. A total of 79 studies concerned single-sample genomic analyses, whereas 14 studies conducted multiple-sample genomic analyses.

The quality assessment revealed that 42 studies (45.2%) were of good quality, 45 (48.4%) were of moderate quality, and six (6.4%) were of low quality ([Supplementary Table 2](#)).

### 3.3. Gene mutation profile of primary RCCs

A total of 57 studies provided data on gene mutations. Using a mutation prevalence threshold of 1% chosen a priori, the final analysis was carried out on the 51 most frequently mutated genes.

For primary RCCs (total of 10 874 samples) the gene mutation prevalence ranged from 1% to 64%, and most studies were heterogeneous for this analysis ([Fig. 2](#) for *VHL*). The four most frequently studied genes were *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, and *BAP1*, for which the mutation prevalence was 64%, 36%, 20%, and 13%, respectively ([Table 1](#)). Notably, the mutation prevalence was also high (>10%) for *ABCB1*,

*TTN*, *MUC4*, *CDK12*, *DNMT3A*, *UGT1A1*, and *ERBB3*, but with only one to three studies included.

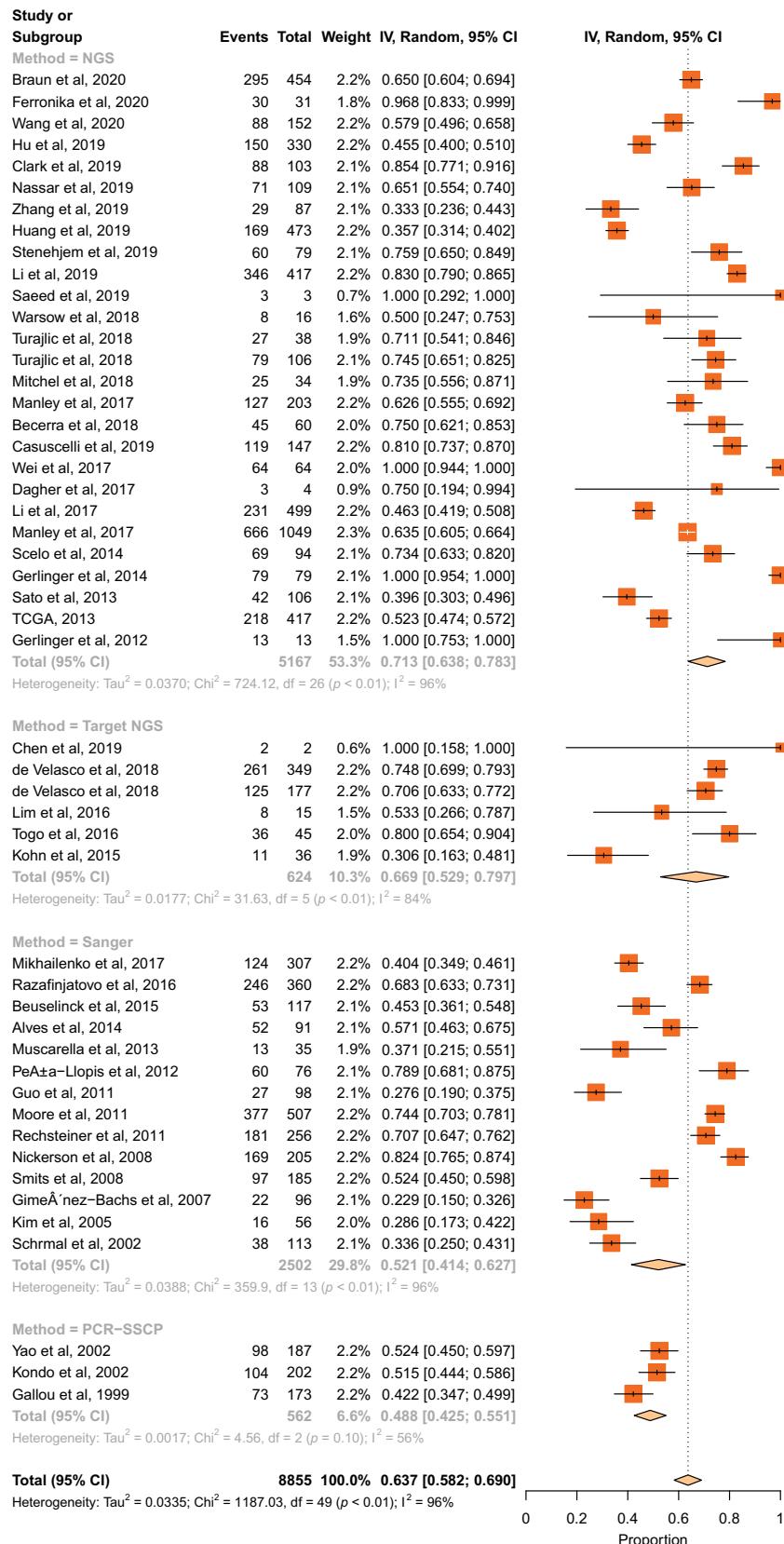
We then focused on *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, and *BAP1* for subgroup analyses using the following parameters: Q-genie quality score (good vs others), gene analysis method (NGS vs target NGS vs Sanger sequencing), tumor preservation conditions (frozen vs formalin-fixed), and sample number (single vs multiple samples).

When we compared studies with good quality scores to the other studies, there was a higher mutation prevalence only for *SETD2* (23% vs 13%,  $p = 0.022$ ; [Table 2](#)).

NGS was the main method used (67.5% of the samples). For the *VHL* and *SETD2* genes, NGS yielded a significantly higher mutation prevalence than Sanger sequencing. Typically, for the *VHL* gene the mutation prevalence was 71% using NGS, compared to 52% using Sanger sequencing ( $p = 0.003$ ; [Table 2](#)).

Surprisingly, mutation prevalence was not significantly different between frozen samples and formalin-fixed samples.

By contrast, multiple sampling significantly increased the values found for mutation prevalence for *VHL*, *PBRM1*, *BAP1*, and *SETD2*, with odds ratios (ORs) ranging from 1.38 to 3.6 ([Table 2](#)). For *VHL*, the mutation prevalence reached almost 100%, rising from 58% with single-sample analysis



**Fig. 2 – Forest plot for VHL mutation prevalence in clear-cell renal cell carcinomas. Publication details for the studies are provided in the supplementary reference list in the Supplementary material. IV = inverse variance; CI = confidence interval; NGS = next-generation sequencing; TCGA = The Cancer Genome Atlas; df = degrees of freedom; PCR-SSCP = polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism.**

**Table 1 – Prevalence of gene mutations in renal cell carcinoma primary tumors<sup>a</sup>**

Gene	Sample size	Studies	Mutation prevalence (%) (95% CI)	Test of heterogeneity I <sup>2</sup>	P
<b>VHL</b>	<b>8,855</b>	2,3,5,6,7,8,11,12,14,15,17,18,20,21,22,23,24,26, 27,28,29,30,31,32,35,36,37,38,39,42,43,44,45,46 ,47,48,49,50,51,53,55,62,63,66,70,79,82,84,92	<b>64 (58-69)</b>	96%	<0.01
<b>PBRM1</b>	<b>6,896</b>	1,2,3,5,6,7,8,12,14,15,16,18, 19,20,21,22,23,24,26,27,28, 29,32,33,36,37,38,42,43,45,47,48,50,51,56	<b>36 (33-38)</b>	72%	<0.01
<b>SETD2</b>	<b>6,163</b>	2,5,6,7,8,11,14,15,16,18,19, 19,20,21,22,23,24,26,27,28,29,32,33,24,26,27 28,29,32,36,37,38,41,43,45,47,48,50,51	<b>20 (16-23)</b>	92%	<0.01
<b>BAP1</b>	<b>6,033</b>	2,3,5,6,7,8,11,14,15,16,18,19, 20,21,22,23,24,26,27,28,29,32,36,37,38,43,45,47 48,51	<b>13 (11-15)</b>	78%	<0.01
<b>MTOR</b>	<b>4,511</b>	2,3,5,8,14,15,17,18,20,22,23,24,26,27,29,32,36,37 43,45,47,48,50	<b>9 (6-12)</b>	89%	<0.01
<b>KDM5C</b>	<b>4,451</b>	2,3,5,7,8,15,18,19,21,22,23,26,27,29,32,36,37,43 45,48,50	<b>10 (8-13)</b>	87%	<0.01
<b>TP53</b>	<b>4,280</b>	3,5,8,11,15,17,19,20,21,22,23,27,32,36,39,45,47, 48,50,51,93	<b>7 (5-9)</b>	79%	<0.01
<b>PTEN</b>	<b>3,720</b>	2,5,8,11,20,21,22,23,27,29,32,36,37,39,45,48,50	<b>7 (4-9)</b>	84%	<0.01
<b>PIK3CA</b>	<b>3,485</b>	2,3,5,8,11,17,22,23,27,29,36,37,45,47,48,51	<b>3 (2-5)</b>	77%	<0.01
<b>TSC1</b>	<b>2,676</b>	2,3,5,8,21,22,23,27,36,37,51,85	<b>5 (3-8)</b>	87%	<0.01
<b>TSC2</b>	<b>2,335</b>	5,11,17,22,23,26,27,29,36,45,85	<b>3 (2-4)</b>	59%	<0.01
<b>TET2</b>	<b>2,163</b>	21,23,26,27,36,37,47,51	<b>3 (2-5)</b>	49%	0.05
<b>ARID1A</b>	<b>1,948</b>	1,3,5,14,18,20,23,26,27,37,45,48,51	<b>2 (1-4)</b>	41%	0.03
<b>ATM</b>	<b>1,429</b>	14,17,23,26,27,29,47	<b>4 (3-6)</b>	33%	0.18
<b>TCEB1</b>	<b>1,401</b>	5,17,23,26,47,48	<b>2 (0.7-3)</b>	44%	0.11
<b>TERT</b>	<b>1,218</b>	17,19,24,26,127,28	<b>7 (3-1.3)</b>	89%	<0.01
<b>CSMD3</b>	<b>1,201</b>	3,5,11,14,20,22,23,43,47,51	<b>8 (6-1.2)</b>	60%	<0.01
<b>NOTCH1</b>	<b>778</b>	17,26,27,51	<b>1 (0.1-3)</b>	56%	0.08
<b>EGFR</b>	<b>583</b>	17,23,27	<b>2 (0-7)</b>	82%	<0.01
<b>EP300</b>	<b>583</b>	17,27,47	<b>5 (3-7)</b>	10%	0.33
<b>NFE2L2</b>	<b>583</b>	23,27,48	<b>2 (0.3-4)</b>	34%	0.22
<b>NF1</b>	<b>523</b>	17,23	<b>4 (2-5)</b>	0%	0.33
<b>POLQ</b>	<b>509</b>	17,45,50	<b>4 (0-1.3)</b>	83%	<0.01
<b>ABCB1</b>	<b>504</b>	11,17	<b>19 (0-79)</b>	99%	<0.01
<b>ROS1</b>	<b>495</b>	3,15,23,27,37,47,51	<b>4 (0.9-86)</b>	73%	<0.01
<b>BRCA2</b>	<b>477</b>	17,27	<b>2 (0-9)</b>	83%	0.02

(continued on next page)

Gene	Sample size	Studies	Mutation prevalence (%) (95% CI)	Test of heterogeneity	
				$I^2$	P
<i>PDGFRA</i>	477	17,27	2 (0-9)	83%	0.02
<i>STAG2</i>	477	27,48	1 (0.4-3)	0%	0.76
<i>MLL3</i>	463	26,27,43,47	5 (3-7)	1%	0.39
<i>ATR</i>	417	17	1 (0.3-2)		
<i>BRCA1</i>	417	17	4 (2-6)		
<b><i>TTN</i></b>	330	6	<b>18 (14-22)</b>		
<i>MLL2</i>	309	26,47	2 (0.8-4)	0%	0.84
<i>NAV3</i>	258	5,23	5 (3-8)	0%	0.47
<i>LRRK2</i>	243	3,23,47	3 (1-6)	0%	0.41
<i>MUC4</i>	228	20,23,47	<b>13 (4-36)</b>	93%	<0.01
<i>TSHZ3</i>	212	23,47	2 (0.3-4)	0%	0.35
<b><i>UGT1A1</i></b>	181	11,37	<b>17 (5-50)</b>	93%	<0.01
<i>KDM6A</i>	166	23,27	4 (1-8)	26%	0.24
<i>ATRX</i>	139	27,45	1 (0-4)	0%	0.82
<i>SF3B1</i>	124	27,29	2 (0.2-6)	0%	0.56
<b><i>CDK12</i></b>	122	20,47	<b>11 (0-50)</b>	91%	<0.01
<i>RPL5</i>	122	20,47	7 (0-31)	83%	0.02
<i>SMC3</i>	106	47	2 (0-7)		
<i>TAF1</i>	106	47	3 (0.6-8)		
<i>USP9X</i>	106	47	2 (0.2-7)		
<i>SMC3</i>	106	47	2 (0-7)		
<b><i>DNMT3A</i></b>	76	20,27	<b>11 (0-40)</b>	83%	0.02
<b><i>CDKN2A</i></b>	60	27	<b>2 (0-9)</b>		
<i>MAP3K1</i>	60	27	2 (0-9)		
<i>NSD1</i>	60	27	2 (0-9)		
<b><i>ERBB3</i></b>	31	3	<b>16 (6-33)</b>		

to 93% using multiple sampling (OR 3.6;  $p < 0.001$ ). This was also true for *KDM5C*, *TP53*, and *PTEN* (Supplementary Table 3).

When we restricted these subgroup analyses (gene analysis method, tumor preservation, and sample numbers) to the 42 articles with high quality scores (8318 samples, 54.6% of all samples), multiple sampling still increased the mutation prevalence values (Supplementary Table 4).

#### 3.4. Some gene mutations expand in RCC metastases

For RCC metastases, a total of 433 samples were analyzed, accounting for five of the 93 studies in this meta-analysis. The data were obtained via single-sample analyses in four out of the five studies. Using a threshold of 1% for mutation prevalence, 31 genes were retained for the final analysis. All of these 31 genes were also identified in primary RCCs. In metastatic samples, the mutation prevalence ranged from 2% to 75%. The four most frequently mutated genes were also *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, and *BAP1*, for which the mutation prevalence was 75%, 41%, 27%, and 18%, respectively (Supplementary Table 5).

When we compared primary tumors to metastases, we observed that the mutation prevalence was significantly more marked for *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, *BAP1*, *KDM5C*, *TP53*, *PTEN*, *TSC1*, *TET2*, and *ARID1A*. For *VHL*, the mutation prevalence increased significantly from 64% in primary tumors to 75% in metastases ( $p < 0.001$ ). By contrast, for *PIK3CA* the mutation prevalence significantly decreased from 3% to 0.5% (Fig. 3A).

Among these 433 samples, a matched primary tumor sample from the same patient was available for only 107 patients, for a total of 124 samples. When we compared primary tumors and metastases across this limited number of patients, there was a nonsignificant increase in mutation prevalence in metastatic compared to primary tumor samples for the most frequently mutated genes, as was the case for all samples in our meta-analysis (Supplementary Fig. 1).

#### 3.5. Loss of heterozygosity and CNAs in primary RCCs and metastases

A total of 51 studies provided data on loss of heterozygosity (LOH) and CNAs.

**Table 2 – Prevalence of common gene mutations in primary renal cell carcinomas according to subgroup analyses**

Gene	Sample size, n (%)	Study IDs <sup>a</sup>	Mutation prevalence, % (95% CI)	p value	Test of heterogeneity I <sup>2</sup> (%)	p value
<b>VHL</b>						
Gene analysis method						
NGS	5167 (58.3)	2, 3, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 36	71 (64–78)	96	<0.01	
Sanger	2502 (28.3)	30, 35, 42, 44, 46, 49, 51, 53, 55, 62, 63, 66, 70, 84	52 (41–63)	<b>0.003</b>	96	<0.01
Target NGS	624 (7.1)	43, 45, 47, 48, 50	67 (53–80)	0.5	84	<0.01
PCR-SSCP	562 (6.3)	79, 82, 73	49 (43–55)	0.054	56	0.1
Tumor preservation conditions <sup>b</sup>						
Frozen	3073 (50.3)	5, 12, 14, 30, 31, 38, 39, 42, 43, 44	62 (52–71)	96	<0.01	
FFPE	3029 (49.7)	2, 3, 6, 7, 8, 11, 15, 17, 20, 22, 23, 24, 35, 37, 46, 55, 62, 6370, 84	64 (56–71)	0.7	95	<0.01
Multiple samples						
No	8510 (96.1)	2, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 15, 17, 18, 21, 22, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 35, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 49, 51, 53, 55, 62, 63, 66, 70, 79, 82, 84, 92	58 (53–63)	95	<0.01	
Yes	345 (3.9)	3, 12, 20, 23, 24, 29, 45, 50	93 (77–100)	<b>&lt;0.001</b>	92	<0.01
Quality assessment						
Good	4848 (54.7)	2, 5, 7, 14, 20, 21, 22, 23, 24, 27, 28, 36, 42, 43, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 62, 63, 79, 84	66 (59–73)	98	<0.01	
Other	4007 (45.3)	3, 6, 8, 11, 12, 15, 17, 18, 26, 29, 30, 31, 32, 35, 37, 38, 39, 44, 46, 53, 55, 66, 70, 82, 92	61 (52–70)	0.3	96	<0.01
<b>PBRM1</b>						
Gene analysis method						
NGS	5836 (84.6)	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 14, 15, 16, 18, 19	37 (34–39)	73	<0.01	
Target NGS	588 (8.5)	12, 21, 37, 38	35 (25–46)	0.8	71	<0.01
Sanger	472 (6.9)	42, 51, 56	30 (22–37)	0.085	65	0.06
Tumor preservation conditions <sup>b</sup>						
Frozen	1490 (43.3)	5, 12, 14, 38, 42, 43, 45, 48, 50, 51	33 (30–38)	55	0.02	
FFPE	1944 (56.6)	1, 2, 3, 6, 7, 8, 15, 16, 19, 20, 22, 23	39 (34–44)	0.7	76	<0.01
Multiple samples						
No	6551 (95.0)	1, 2, 5, 6, 7, 8, 14, 15, 16, 18, 19, 21	35 (34–36)	70	<0.01	
Yes	345 (5.0)	3, 12, 20, 23, 24, 29, 45, 50	42 (33–54)	<b>0.043</b>	76	<0.01
Quality assessment						
Good	4885 (70.8)	1, 2, 5, 7, 14, 19, 29, 21, 22, 23, 24, 27, 36, 42, 43, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 56	37 (34–40)	74	<0.01	
Other	2011 (29.2)	3, 6, 8, 12, 15, 16, 18, 26, 29, 32, 33, 37, 38	32 (28–36)	0.11	58	<0.01
<b>SETD2</b>						
Gene analysis method						
NGS	5479 (88.9)	2, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 32, 36, 41, 43, 45, 47, 48, 50	20 (16–24)	92	<0.01	
Target NGS	586 (9.5)	21, 37, 38	25 (20–31)	0.5	36	0.19
Sanger	98 (1.6)	51	04 (1–10)	<b>0.049</b>		
Tumor preservation conditions <sup>b</sup>						
Frozen	1371 (43.1)	5, 14, 38, 43, 45, 48, 50, 51	19 (11–28)	92	<0.01	
FFPE	1811 (56.9)	2, 6, 7, 8, 11, 15, 16, 19, 20, 22, 23, 37	23 (16–31)	0.9	92	<0.01
Multiple samples						
No	5810 (94.9)	2, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 15, 16, 18, 19, 21, 22, 26, 27, 28, 32, 36, 37, 38, 41, 43, 47, 48, 51	16 (13–19)	89	<0.01	
Yes	312 (5.1)	20, 23, 24, 29, 45, 50	46 (26–67)	<b>&lt;0.001</b>	92	<0.01
Quality assessment						
Good	4646 (74.4)	2, 5, 7, 14, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 27, 28, 36, 41, 43, 45, 47, 48, 50, 51	23 (18–28)	74	<0.01	
Other	1517 (24.6)	6, 8, 11, 15, 16, 18, 26, 29, 32, 37, 38	13 (8–18)	<b>0.022</b>	58	<0.01
<b>BAP1</b>						
Gene analysis method						
NGS	5349 (88.7)	2, 3, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 15, 16, 18, 19	13 (11–16)	81	<0.01	
Target NGS	586 (9.7)	21, 37, 38	13 (10–16)	0.7	0	0.9
Sanger	98 (1.6)	51	9 (4–17)	0.4		
Tumor preservation conditions <sup>b</sup>						
Frozen	1534 (45.4)	5, 14, 38, 43, 45, 48, 51	11 (9–14)	56	0.02	
FFPE	1842 (54.6)	2, 3, 6, 7, 8, 11, 15, 16, 19, 20, 22, 23, 24, 37	16 (11–21)	0.3	85	<0.01

(continued on next page)

Gene	Sample size, n (%)	Study IDs <sup>a</sup>	Mutation prevalence, % (95% CI)			$\chi^2$ (%)	Test of heterogeneity p value
					$p$ value		
Multiple samples							
No	5703 (94.5)	2, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 16, 18, 19, 21, 22, 26, 27, 28, 32, 36, 37, 38, 43, 47, 48, 51	12 (10–14)	75	<0.01		
Yes	330 (5.5)	3, 20, 23, 24, 29, 45	24 (20–29)	<0.001	0	2.69	
Quality assessment							
Good	4485 (74.3)	2, 5, 7, 14, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 27, 28, 36, 43, 45, 47, 48, 51	14 (12–17)	76	<0.01		
Other	1548 (25.7)	3, 6, 8, 11, 15, 16, 18, 26, 29, 32, 37, 38	11 (7–15)	0.2	79	<0.01	

NGS = next-generation sequencing; FFPE = formalin-fixed paraffin-embedded; PCR-SSCP = polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism; CI = confidence interval.

<sup>a</sup> Study ID numbers refer to the studies listed in Supplementary Table 1, for which the publication details are provided in the supplementary reference list.

<sup>b</sup> Adjusted for methods to detect gene mutation.

For primary RCCs (total of 6018 samples and 4994 patients), LOH and CNA prevalence ranged from 5% to 99%. The four chromosome losses that were most frequently identified were 3p25.3, 4q, 6q22.33, and 8p23.2, with prevalence rates of 85%, 41%, 34%, and 34% respectively (Supplementary Fig. 2). The four most frequently identified chromosome gains were 5q35.3, 7q22.3, 8q24.21, and 20q13.33 with prevalence rates of 71%, 54%, 35%, and 44% respectively. In addition, a 3p LOH was reported in 86% of cases. For RCC metastases, a total of 307 samples were analyzed for 227 patients; the LOH and CNA mutation prevalence rates ranged from 5% to 99%. The four most frequent chromosome losses were 3p25.3, 9p21.3, 3p, and 9, with prevalence rates of 85%, 76%, 64%, and 34% respectively (Supplementary Fig. 2). The four most frequent chromosome gains were 1q21.3, 7q36.3, 20q11.21, and 5, with prevalence rates of 61%, 57%, 50%, and 34% respectively. In addition, 3p LOH was reported in 19% of cases, but this was for a small number of samples ( $n = 32$ ).

Comparison of primary RCCs and metastases revealed a significant increase in the prevalence of losses for chromosomes 1p36.11, 9p21.3, and 18, and of gains for chromosomes 1q21.3, 7q36.3, 8q, and 20q11.21. By contrast, chromosome 3p loss significantly decreased from 84% in primary tumors to 64% in metastases (Fig. 3B). In particular, *ARID1A*, located at the 1p36.11 locus and lost in 54% of metastatic RCCs, was also more frequently mutated in metastases compared to primary RCCs (10% vs. 1.7%;  $p = 0.019$ ; Fig. 3A). *CDKN2A*, also called *p16*, is located at the 9p21.3 locus and was lost in 76% of metastatic samples. By contrast, we observed a copy-number gain for *SETDB1* located at 1q21.3 and amplified in 61% of metastatic RCCs. Both *p16* loss and *SETDB1* amplification are involved in cell cycle progression (Fig. 4D). *ASXL1*, located at 20p11.21 and amplified in 50% of metastatic RCCs compared to 21% of primary tumors ( $p < 0.001$ ), is closely linked to *BAP1* function (Fig. 4B).

### 3.6. Heterogeneity of mutation prevalence

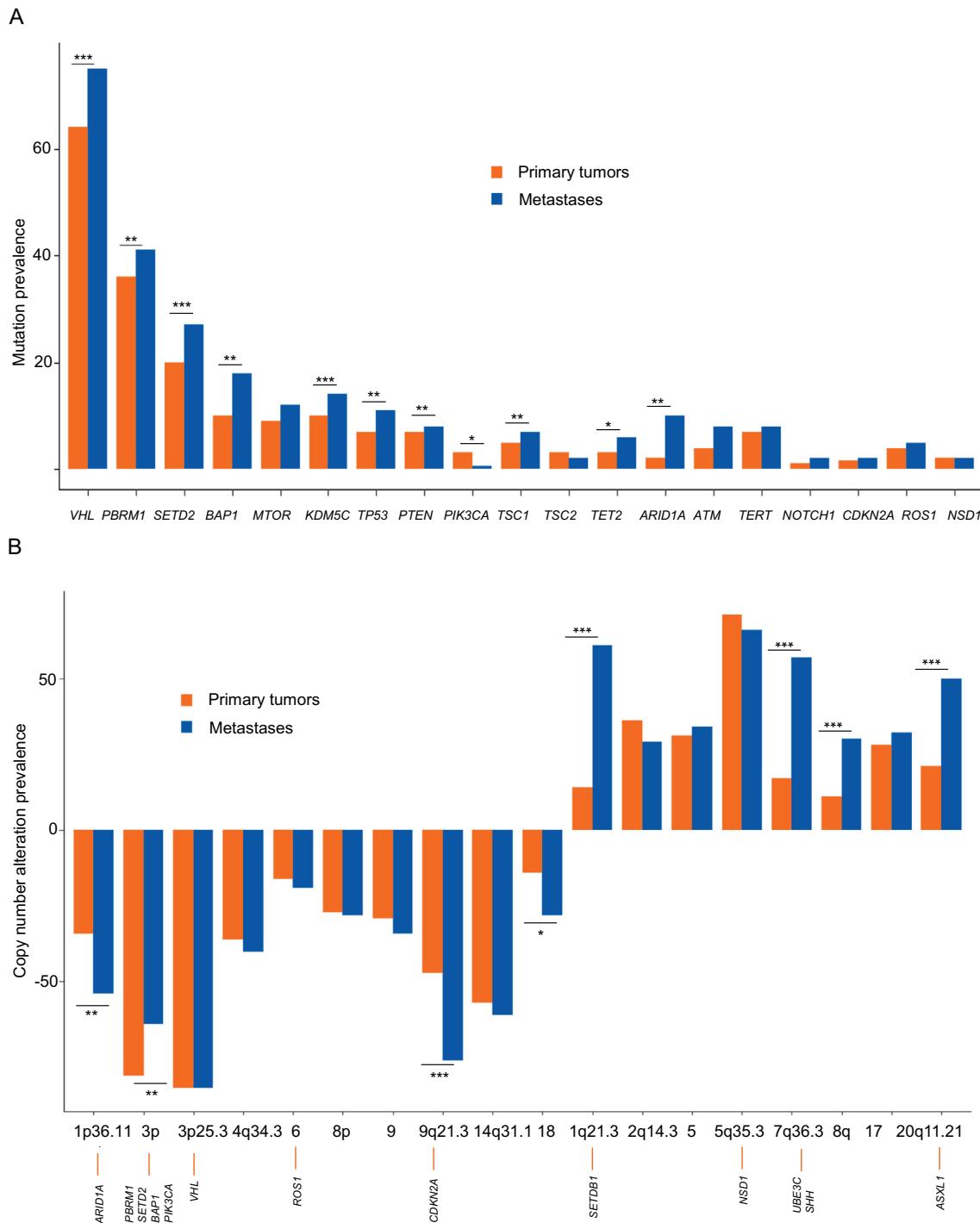
Given the heterogeneity of mutation prevalence among primary tumors, we used the random effect to express the overall prevalence for each gene analyzed. We then sought to understand the reasons for heterogeneity and performed various subgroup analyses for primary tumor samples: the studies remained heterogeneous. By contrast, when we only considered metastatic samples, there was no heterogeneity across studies for the 24 genes analyzed, except for *PTEN*, *TET2*, and *TSC2*.

### 3.7. Discussion

We report here the first meta-analysis of genomic data from RCCs. The meta-analysis provides more reliable results for gene mutation prevalence than data obtained from individual sources.

The four most frequently mutated genes were *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, and *BAP1*.

*VHL* is a tumor suppressor gene located on chromosome 3p. It was mutated in 93% of primary RCCs in the case of studies involving multiple sampling and is thus at the core



**Fig. 3 – Pooled proportion of gene mutations in primary tumors and metastases from 14 696 patients with renal cell carcinoma.** \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ .

of RCC carcinogenesis (Fig. 4A). The VHL protein is the substrate recognition component for the E3 ligase complex, including TCEB1 and CUL2. TCEB1, also called ELOC (Elongin-C), is located on chromosome 8q21.11 and was mutated in 2% of cases or lost in up to 19% of cases in our meta-analysis; thus, TCEB1 could participate in inactivation of the VHL complex in RCC carcinogenesis [11]. The VHL complex targets the  $\alpha$  subunits of the hypoxia-inducible factors HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  for ubiquitin-mediated degrada-

tion [12]. In cases of VHL inactivation (mutation, 3p loss, hypermethylation) or mutation of the VHL complex members, HIF1 $\alpha$  accumulates in the cytoplasm and forms heterodimers with HIF1 $\beta$ , which acts as a potent transcriptional proangiogenic factor in RCC carcinogenesis [12].

The three other most frequently mutated genes, PBRM1, SETD2, and BAP1, are also located on chromosome 3p. All three are chromatin modifiers, contributing to DNA repair

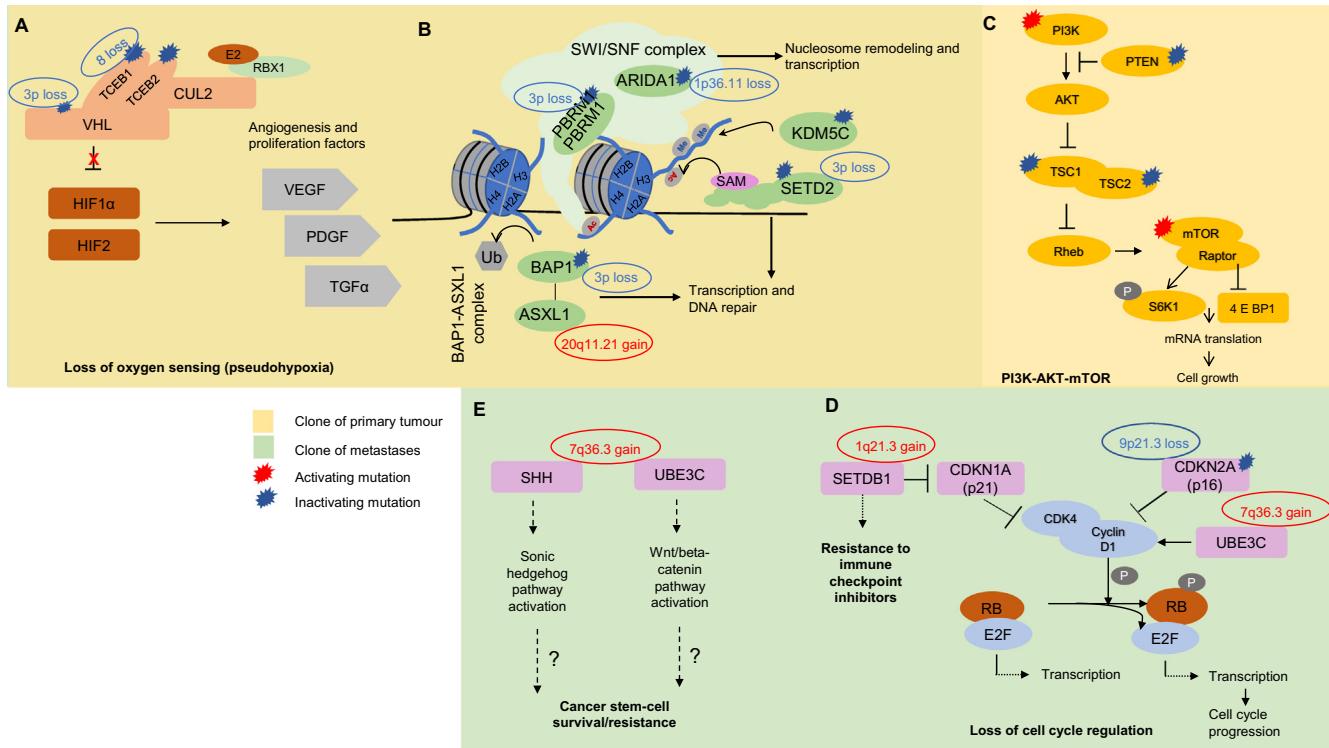


Fig. 4 – Main gene alterations and signaling pathways involved in carcinogenesis in clear-cell renal cell carcinoma.

and transcriptional regulation (Fig. 4B). These are early events in RCC carcinogenesis, and loss of these genes favors genetic instability. Mutations in *BAP1* and *PBRM1* are usually exclusive [13]. *PBRM1* encodes the chromatin-targeting subunit BAF180 in the ATP-dependent SWI/SNF chromatin remodeling complex, implicated in proliferation, replication, transcription, and DNA repair [14]. Besides chromatin remodeling, histone modifications could also play a critical role [15]. *SETD2* (the SET domain containing protein 2) is a methyltransferase responsible for trimethylation of lysine 36 residues on histone H3 (ie, H3K36me3), which in turn is involved in regulating transcription and mediating DNA damage repair [16]. *BAP1* is a nuclear-localized deubiquitinating enzyme and a tumor suppressor protein; its function is to deubiquitinate the transcriptional regulator HCF1 implicated in chromatin remodeling, with additional roles in regulation of E2F family transcription factors and downstream cell-cycle regulation. Therefore, loss of *BAP1* leads to cell proliferation and tumorigenesis [17].

In our meta-analysis, seven other genes reached a mutation prevalence of >10%, but were only identified in a limited number of studies (one study for *TTN* and *ERBB3*, two studies for *ABCB1*, *CDK12*, *DNMT3A*, and *UTGA1*, and three studies for *MUC4*). *ABCB1*, located on 7q21.1, encodes P-glycoprotein, which is a major drug transporter. Zhang et al [18] observed a 50% mutation prevalence for *ABCB1* in RCCs from 87 Chinese patients. In a study by Li et al [19], the *ABCB1* mutation prevalence was only 2% in 417 RCCs from The Cancer Genome Atlas. A similar observation was made for the two studies assessing the prevalence of

*UGT1A1*. These high mutation prevalence rates for *ABCB1* and *UGT1A1* in RCCs obtained from Chinese patients could be attributable to the genetics of the population.

An important result from our meta-analysis is that formalin-fixed samples provided reliable data on gene mutation prevalence, confirming that they are suitable for sequencing in routine practice. However, one should bear in mind that formalin fixation could lead to underdetection of some abnormalities because of conformational DNA changes and DNA breaks [20]. Frozen samples should remain the gold standard for research purposes [21].

Our meta-analysis also confirmed the added value of using multiple-sample sequencing to avoid underestimation of mutation prevalence as a result of tumor heterogeneity. Indeed, primary RCCs usually comprise clonal, subclonal, and private mutations, challenging mutation detection for minority clones [22]. Our meta-analysis confirmed that sequencing from several distinct regions of a primary tumor increased the robustness of clonal mutation detection, and this was particularly true for the four most frequently mutated genes (*VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, and *BAP1*). Surprisingly, we did not identify any significant mutation prevalence for most variants, and this could be a limitation in our meta-analysis. In our meta-analysis, only eight of the 93 studies that we included conducted multiple-sample analyses, corresponding to 169 patients (1.1% of the total number of patients in this meta-analysis) and 345 samples. This discrepancy for low-prevalence variants could be linked to insufficient coverage for some mutations [22], with a risk of underestimating the detection of subclonal or private mutations. An alternative method to multiple

sampling, the Req-Seq method, which pools samples from the same tumor in a single analysis, seems a promising approach [23].

One strength of our meta-analysis is that we compared genomic data obtained from primary RCCs and metastases. This is of major importance, since metastatic cells can derive from minority clones within the primary tumor [24]. Our meta-analysis revealed that all genetic alterations identified in metastatic samples had already been identified in the primary tumors, but with some significant variations that have prognostic and therapeutic implications. Alterations in the *VHL* gene seem not to have prognostic value, or to predict response to antiangiogenic tyrosine kinase inhibitors (TKIs) [25]. In fact, *VHL* expression is almost constantly lost in metastatic clear-cell RCCs when all possible alterations are considered (3p loss and mutations found in almost 90% of patients in our meta-analysis, and epigenetic silencing with *VHL* promoter hypermethylation in 8% of patients with RCCs) [26]. While this was not the focus of our meta-analysis, epigenetic modifications have major implications in RCC carcinogenesis. A subgroup of 37% of clear cell RCCs with increased DNA hypermethylation can be identified, which is associated with *SETD2* mutations, metastatic stage, and shorter survival [27]. The list of tumor-related genes silenced by DNA hypermethylation has been increasing, which opens translational research perspectives in gene therapy.

*PBRM1*, *BAP1*, *SETD2*, *KDM5C*, and *TP53* have been studied for a link between gene alterations and response to treatment. *PBRM1* loss of function seems predictive of response to antiangiogenic TKIs and could thus be associated with better prognosis among patients with metastatic disease [28–31], whereas *PBRM1* mutations are associated with metastatic risk and poorer prognosis in localized disease [32]. Regarding checkpoint inhibitors, despite limited data and some contradictory results, it seems that treatment with nivolumab is associated with better survival among patients with *PBRM1* mutations [31,33–35]. In fact, *PBRM1*, *SETD2*, *BAP1*, *TP53*, and *KDM5C* mutations could be associated with different immune infiltrate patterns in the tumor, explaining different patterns of responses to immunotherapies depending on the mutational status [36]. As in the case of *PBRM1*, mutations in *BAP1* and *TP53* could be linked to metastatic risk [24,37]. However, their loss of function is also associated with resistance to antiangiogenic TKIs [29,30]. Further studies are required to confirm these promising results with potential for better tailoring of the treatment of metastatic RCC. A new classification in four groups has been developed in which the mutational status of *BAP1*, *TP53*, and *PBRM1* is integrated. This new genetically annotated classification is more discriminant than the clinical-biological classification [38] and could be used for future clinical trials in metastatic RCC. The mutational status of *BAP1*, *TP53*, and *PBRM1* in primary tumors could also be integrated to guide therapeutic decisions in the adjuvant setting when treatment with sunitinib is required [39].

Two other genes involved in the *PBRM1*-*SETD2*-*BAP1* signaling pathway were much more frequently altered in metastases compared to the primary tumors: *ASXL1* was amplified in 50% of cases and *ARID1A* was lost in 54% of

metastatic RCCs. *ASXL1*, located on chromosome 20p11.21, is the regulatory subunit of a deubiquitinase complex, for which the catalytic subunit is *BAP1*. *ARID1A*, located on 1p36.11, encodes different subunits of the SWI/SNF complex. Our results suggesting a role of *ARID1A* loss in driving metastatic progression of RCCs concur with the observation of frequent underexpression of *ARID1A* in 404 primary RCCs, itself associated with poor prognosis [40,41]. *ARID1A* mutations frequently occur in ovarian and gastric cancers, and *ARID1A* function loss is also associated with poor prognosis in these other cancer types [42].

By contrast, our meta-analysis revealed that *PIK3CA* mutation prevalence decreased significantly in metastatic RCC compared to primary tumors. This could be counterintuitive, as *PIK3CA* mutations are associated with metastatic spread in other cancer types such as breast cancer [43]. In fact, the PIK3CA-AKT-mTOR pathway is frequently altered in RCCs, in 25–30% of primary tumors and metastases (Fig. 4C). Typically, we showed that the decrease in *PIK3CA* mutation prevalence was potentially compensated by a significant increase in *mTOR* mutation prevalence (from 9% in primary tumors to 12% in metastases). Activating mutations in the mTOR pathway, including *MTOR*, *TSC1*, *TSC2*, *NF1*, and *PIK3CA* mutations, seem to be associated with greater sensitivity to everolimus [44]. mTOR inhibitors are still currently approved for the treatment of metastatic RCCs, but with low benefit [45]. Their prescription could be reappraised in light of mutational status.

*SHH* and *UBE3C*, located on 7q36.3 (Fig. 4E), were amplified in 57% of metastatic RCCs compared to 17% of primary RCCs in our meta-analysis. *SHH* [46] and *UBE3C* [47] overexpression, through activation of sonic hedgehog and Wnt/β-catenin pathways, respectively, could be associated with cancer stem-cell maintenance, itself known to be associated with drug resistance and metastasis progression [48,49].

*CDKN2A*, also called *p16* and lost in 76% of metastatic RCCs in our meta-analysis, and *SETDB1*, amplified in 61% of metastatic RCCs, are typically linked to the metastatic signature (Fig. 4D). *p16* has an inhibitory effect on *CDK4* and cyclin D1, which are both factors that drive the cell cycle and play a key role in the metastatic progression of various malignant tumors. *SETDB1*, through *CDKN1A/p21* inhibition, activates the complex *CDK4/cyclin D1*. *CDK4/6* inhibitors are currently approved for the treatment of metastatic breast cancer [50,51]. Palbociclib is currently being evaluated in clinical trials using tumor sequencing for personalized treatment of various cancers, including metastatic renal cancer. Similar personalized clinical trials could also be useful to assess the benefit of targeting rare mutations when a specific drug is available. In addition, *SETDB1* expression seems to be closely linked to resistance to immune checkpoint inhibitors such as nivolumab and pembrolizumab [52], and thus could be a promising target for treatment of metastatic RCC.

Our meta-analysis has some limitations. It was performed on published data and not individual data. For this reason, some subgroup analyses could not be performed because of missing data (data for systemic treatments, age, gender, and ethnicity). In addition, there were limited

data on paired samples (primary tumors and metastases from the same patients) and on tumor mutational burden (TMB), thus limiting reliable analyses. TMB, which partly reflects gene abnormalities in a tumor, has been considered as a biomarker predictive of response to immune checkpoint inhibitors [53], while the data remain controversial for metastatic clear-cell RCCs [54]. This is particularly true for the clonal TMB (ie, the number of mutations estimated to be present in every cancer cell), but probably not for the subclonal TMB [23]. In addition, single sampling could overestimate TMB in a tumor when compared to multiple sampling. In our meta-analysis, only two studies assessed TMB, neither of which used multiple sampling [18,37]. Some prevalence values for gene alterations should be interpreted with caution when they only concern a few studies and thus limited numbers of patients.

Another limitation of our meta-analysis is the heterogeneity of studies for our analysis of primary tumors, despite various subgroup analyses to address this limitation. By contrast, for metastatic samples there was no heterogeneity across studies for the 24 genes studied, except for *PTEN*, *TET2*, and *TSC2*. This is a major result of our meta-analysis, since micrometastatic and macrometastatic clones are the ones we need to eradicate with medical treatments. This highlights the need to preferentially biopsy metastases for genomic studies, and not just the primary tumor, when this is possible.

#### 4. Conclusions

This is the first meta-analysis of genomic alterations in clear cell RCC and shows significant differences in the prevalence of gene alterations between primary tumors and metastases, with the added value of using multiple sampling to identify these alterations more accurately.

Our results underline the added value of biopsies of RCC metastases to fully explore the biology of metastatic disease for therapeutic purposes. In the adjuvant setting with potential micrometastatic disease, genomic data for primary tumors could also be useful for decisions on whether to initiate adjuvant treatment.

**Author contributions:** Guilhem Bousquet had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

**Study concept and design:** Bousquet, Pamoukdjian, Bui.

**Acquisition of data:** Bui, Bousquet.

**Analysis and interpretation of data:** Bui, Dao, Nguyen, Pamoukdjian, Feugeas, Bousquet.

**Drafting of the manuscript:** Bui, Bousquet.

**Critical revision of the manuscript for important intellectual content:** Feugeas.

**Statistical analysis:** Bui, Pamoukdjian, Bousquet.

**Obtaining funding:** Bousquet.

**Administrative, technical, or material support:** Bousquet.

**Supervision:** Bousquet.

**Other:** None.

**Financial disclosures:** Guilhem Bousquet certifies that all conflicts of interest, including specific financial interests and relationships and affiliations relevant to the subject matter or materials discussed in the manuscript (eg, employment/affiliation, grants or funding, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, royalties, or patents filed, received, or pending), are the following: None.

**Funding/Support and role of the sponsor:** This study was supported by Bourse d'Excellence de l'Ambassade de France au Viet Nam (grant number 971522C) and INSERM. The sponsors played a role in the design and conduct of the study; data collection, management, analysis, and interpretation; and preparation, review, and approval of the manuscript.

**Acknowledgments:** We thank Ms. Angela Swaine and Sarah Leyshon for revision of the English language.

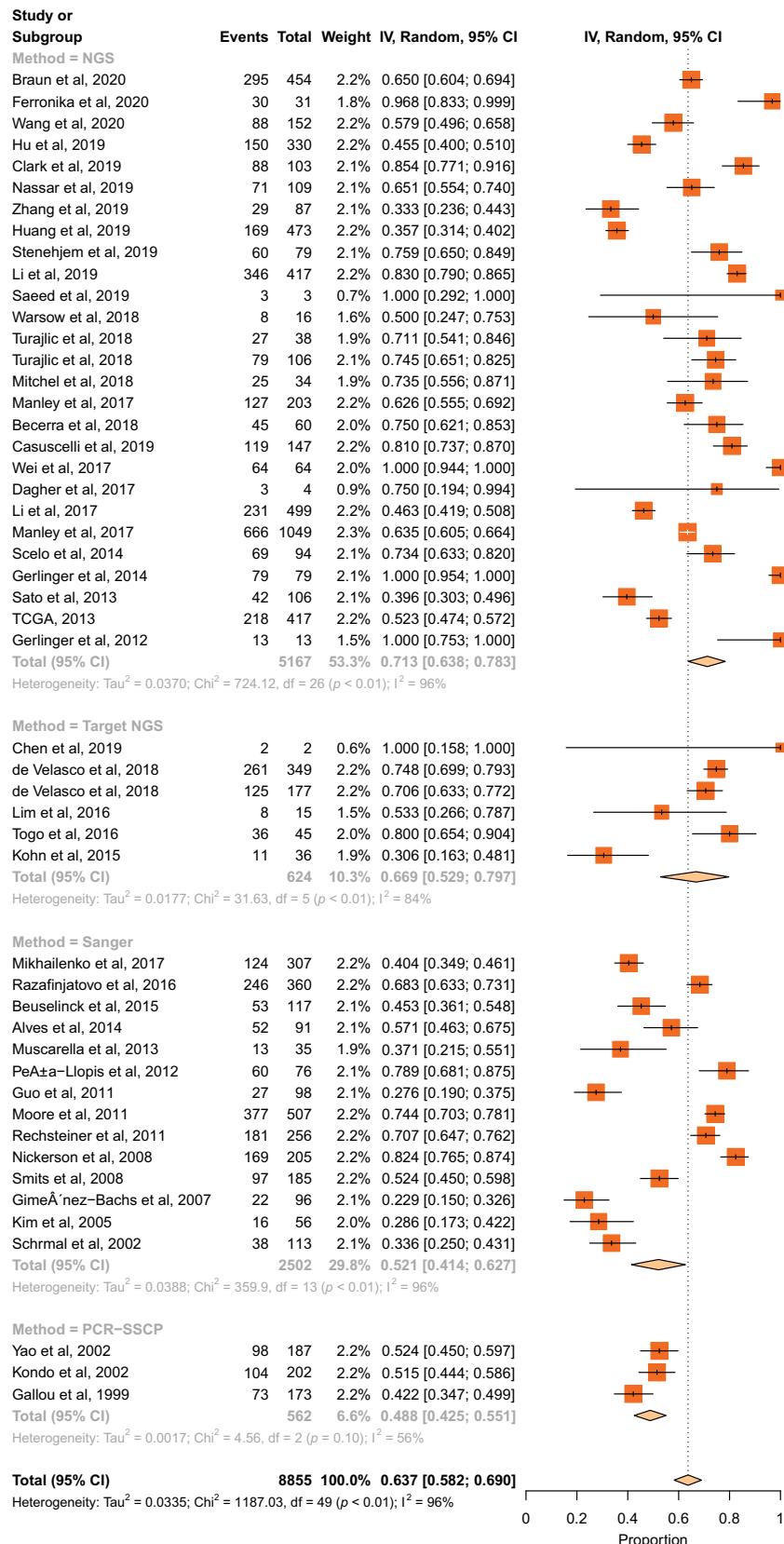
#### Peer Review Summary

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2021.12.010>.

#### References

- [1] Padala SA, Barsouk A, Thandria KC, et al. Epidemiology of renal cell carcinoma. *World J Oncol* 2020;11:79–87. <https://doi.org/10.14740/wjon1279>.
- [2] van der Poel HG, Mulders PF, Oosterhof GO, et al. Prognostic value of karyometric and clinical characteristics in renal cell carcinoma. Quantitative assessment of tumor heterogeneity. *Cancer* 1993;72:2667–74. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19931101\)72:9<2667::aid-cncr2820720924>3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19931101)72:9<2667::aid-cncr2820720924>3.0.co;2-0).
- [3] Giuliani L, Giberti C, Martorana G, Rovida S. Radical extensive surgery for renal cell carcinoma: long-term results and prognostic factors. *J Urol* 1990;143:468–73. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)39992-5](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)39992-5).
- [4] Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893–917. <https://doi.org/10.1002/ijc.25516>.
- [5] Volpe A, Patard JJ. Prognostic factors in renal cell carcinoma. *World J Urol* 2010;28:319–27. <https://doi.org/10.1007/s00345-010-0540-8>.
- [6] Pirrotta MT, Bernardeschi P, Fiorentini G. Targeted-therapy in advanced renal cell carcinoma. *Curr Med Chem* 2011;18:1651–7. <https://doi.org/10.2174/092986711795471293>.
- [7] Makhov P, Joshi S, Ghatalia P, Kutikov A, Uzzo RG, Kolenko VM. Resistance to systemic therapies in clear cell renal cell carcinoma: mechanisms and management strategies. *Mol Cancer Ther* 2018;17:1355–64. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-1299>.
- [8] Beksac AT, Paulucci DJ, Blum KA, Yadav SS, Sfakianos JP, Badani KK. Heterogeneity in renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2017;35:507–15. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2017.05.006>.
- [9] Stewart LA, Clarke M, Rovers M, et al. Preferred Reporting Items for a Systematic Review and Meta-analysis of Individual Participant Data: the PRISMA-IPD statement. *JAMA* 2015;313:1657. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.3656>.
- [10] Sohani ZN, Meyre D, de Souza RJ, et al. Assessing the quality of published genetic association studies in meta-analyses: the quality of genetic studies (Q-Genie) tool. *BMC Genet* 2015;16:50. <https://doi.org/10.1186/s12863-015-0211-2>.
- [11] Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, et al. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat Genet* 2013;45:860–7. <https://doi.org/10.1038/ng.2699>.
- [12] Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest* 2013;123:3664–71. <https://doi.org/10.1172/JCI67230>.
- [13] Peña-Llopis S, Vega-Rubín-de-Celis S, Liao A, et al. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nat Genet* 2012;44:751–9. <https://doi.org/10.1038/ng.2323>.
- [14] Reisman D, Glaros S, Thompson EA. The SWI/SNF complex and cancer. *Oncogene* 2009;28:1653–68. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.4>.

- [15] Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA. Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat Biotechnol* 2010;28:1069–78. <https://doi.org/10.1038/nbt.1678>.
- [16] Sun X-J, Wei J, Wu X-Y, et al. Identification and characterization of a novel human histone H3 lysine 36-specific methyltransferase. *J Biol Chem* 2005;280:35261–71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504012200>.
- [17] Gallan AJ, Parilla M, Segal J, Ritterhouse L, Antic T. BAP1-mutated clear cell renal cell carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2021;155:718–28. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa176>.
- [18] Zhang S, Wang B, Zhang F, Ye J, Ge L, Ma L. Genomic alterations of renal cell carcinoma and clinical implications in the Chinese population. *Med Sci Monit* 2019;25:2959–65. <https://doi.org/10.12659/MSM.914493>.
- [19] Li J, Guo L, Chai L, Ai Z. Comprehensive analysis of driver genes in personal genomes of clear cell renal cell carcinoma 153303381983096. *Technol Cancer Res Treat* 2019;18. <https://doi.org/10.1177/1533033819830966>.
- [20] Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 2002;161:1961–71. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64472-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64472-0).
- [21] Gaffney E, Riegman P, Grizzle W, Watson P. Factors that drive the increasing use of FFPE tissue in basic and translational cancer research. *Biotech Histochem* 2018;93:373–86. <https://doi.org/10.1080/10520295.2018.1446101>.
- [22] Pongor LS, Munkácsy G, Vereczkey I, Pete I, Győrffy B. Currently favored sampling practices for tumor sequencing can produce optimal results in the clinical setting. *Sci Rep* 2020;10:14403. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71382-3>.
- [23] Litchfield K, Reading JL, Puttik C, et al. Meta-analysis of tumor- and T cell-intrinsic mechanisms of sensitization to checkpoint inhibition 596–614.e14. *Cell* 2021;184. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.002>.
- [24] Bousquet G, El Bouchtaoui M, Leboeuf C, et al. Tracking sub-clonal TP53 mutated tumor cells in human metastatic renal cell carcinoma. *Oncotarget* 2015;6:19279–89. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4220>.
- [25] Kim JH, Kim HS, Kim BJ. Prognostic value of KRAS mutation in advanced non-small-cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors: a meta-analysis and review. *Oncotarget* 2017;8:48248–52. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17594>.
- [26] Nickerson ML, Jaeger E, Shi Y, et al. Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. *Clin Cancer Res* 2008;14:4726–34. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4921>.
- [27] Ricketts CJ, De Cubas AA, Fan H, et al. The Cancer Genome Atlas comprehensive molecular characterization of renal cell carcinoma 313–26.e5. *Cell Rep* 2018;23. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.075>.
- [28] Ho TH, Choueiri TK, Wang K, et al. Correlation between molecular subclassifications of clear cell renal cell carcinoma and targeted therapy response. *Eur Urol Focus* 2016;2:204–9. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2015.11.007>.
- [29] Fay AP, de Velasco G, Ho TH, et al. Whole-exome sequencing in two extreme phenotypes of response to VEGF-targeted therapies in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *J Natl Compr Cancer Netw* 2016;14:820–4. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2016.0086>.
- [30] Voss MH, Reising A, Cheng Y, et al. Genomically annotated risk model for advanced renal-cell carcinoma: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol* 2018;19:1688–98. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30648-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30648-X).
- [31] McDermott DF, Husen MA, Atkins MB, et al. Clinical activity and molecular correlates of response to atezolizumab alone or in combination with bevacizumab versus sunitinib in renal cell carcinoma. *Nat Med* 2018;24:749–57. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0053-3>.
- [32] Carril-Ajuria L, Santos M, Roldán-Romero JM, Rodriguez-Antona C, de Velasco G. Prognostic and predictive value of PBRM1 in clear cell renal cell carcinoma. *Cancers* 2019;12:E16. <https://doi.org/10.3390/cancers12010016>.
- [33] Braun DA, Ishii Y, Walsh AM, et al. Clinical validation of PBRM1 alterations as a marker of immune checkpoint inhibitor response in renal cell carcinoma. *JAMA Oncol* 2019;5:1631–3. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.3158>.
- [34] Braun DA, Hou Y, Bakouny Z, et al. Interplay of somatic alterations and immune infiltration modulates response to PD-1 blockade in advanced clear cell renal cell carcinoma. *Nat Med* 2020;26:909–18. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0839-y>.
- [35] Bi K, He MX, Bakouny Z, et al. Tumor and immune reprogramming during immunotherapy in advanced renal cell carcinoma e5. *Cancer Cell* 2021;39:649–61. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.02.015>.
- [36] Chakiryan NH, Hajiran A, Kim Y, et al. Correlating immune cell infiltration patterns with recurrent somatic mutations in advanced clear cell renal cell carcinoma. *Eur Urol Focus*. In press. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2021.04.014>.
- [37] Hakimi AA, Attalla K, DiNatale RG, et al. A pan-cancer analysis of PBAF complex mutations and their association with immunotherapy response. *Nat Commun* 2020;11:4168. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17965-0>.
- [38] Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, Russo P, Mazumdar M. Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2002;20:289–96. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.1.289>.
- [39] Ravaud A, Motzer RJ, Pandha HS, et al. Adjuvant sunitinib in high-risk renal-cell carcinoma after nephrectomy. *N Engl J Med* 2016;375:2246–54. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611406>.
- [40] Girgis AH, Iakovlev VV, Beheshti B, et al. Multilevel whole-genome analysis reveals candidate biomarkers in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2012;72:5273–84. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0656>.
- [41] Lichner Z, Scorilas A, White NMA, et al. The chromatin remodeling gene ARID1A is a new prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2013;182:1163–70. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.01.007>.
- [42] Wu JN, Roberts CWM. ARID1A mutations in cancer: another epigenetic tumor suppressor? *Cancer Discov* 2013;3:35–43. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0361>.
- [43] Bertucci F, Finetti P, Guille A, et al. Comparative genomic analysis of primary tumors and metastases in breast cancer. *Oncotarget* 2016;7:27208–19. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8349>.
- [44] Lim SM, Park HS, Kim S, et al. Next-generation sequencing reveals somatic mutations that confer exceptional response to everolimus. *Oncotarget* 2016;7:10547–56. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7234>.
- [45] Hasskarl J. Everolimus. In: Martens U, editor. Small molecules in oncology. Recent results in cancer research, vol. 211. Cham, Switzerland: Springer; 2018. p. 101–23. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-91442-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-91442-8_8).
- [46] Kotulak-Chrzaszcz A, Klacz J, Matuszewski M, Kmiec Z, Wierzbicki P. Expression of the Sonic Hedgehog pathway components in clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Lett* 2019;18:5801–10. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10919>.
- [47] Wen JL, Wen XF, Li RB, et al. UBE3C promotes growth and metastasis of renal cell carcinoma via activating Wnt/β-catenin pathway. *PLoS One* 2015;10:e0115622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115622>.
- [48] Bousquet G, El Bouchtaoui M, Sophie T, et al. Targeting autophagic cancer stem-cells to reverse chemoresistance in human triple negative breast cancer. *Oncotarget* 2017;8:35205–21. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16925>.
- [49] Varma M, Gapihan G, Feugeas J-P, et al. Stem cells increase in numbers in perinecrotic areas in human renal cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21:916–24. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0666>.
- [50] Chen D, Sun X, Zhang X, Cao J. Inhibition of the CDK4/6-cyclin D-Rb pathway by ribociclib augments chemotherapy and immunotherapy in renal cell carcinoma. *BioMed Res Int* 2020;2020:9525207. <https://doi.org/10.1155/2020/9525207>.
- [51] Turner NC, Slamon DJ, Ro J, et al. Overall survival with palbociclib and fulvestrant in advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2018;379:1926–36. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1810527>.
- [52] Griffin GK, Wu J, Iracheta-Vellve A, et al. Epigenetic silencing by SETDB1 suppresses tumour intrinsic immunogenicity. *Nature* 2021;595:309–14. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03520-4>.
- [53] Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2019;19:133–50. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0116-x>.
- [54] Raimondi A, Sepe P, Zattarin E, et al. Predictive biomarkers of response to immunotherapy in metastatic renal cell cancer. *Front Oncol* 2020;10:1644. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01644>.



**Fig. 2 – Forest plot for VHL mutation prevalence in clear-cell renal cell carcinomas. Publication details for the studies are provided in the supplementary reference list in the Supplementary material. IV = inverse variance; CI = confidence interval; NGS = next-generation sequencing; TCGA = The Cancer Genome Atlas; df = degrees of freedom; PCR-SSCP = polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism.**

**Table 1 – Prevalence of gene mutations in renal cell carcinoma primary tumors<sup>a</sup>**

Gene	Sample size	Studies	Mutation prevalence (%) (95% CI)	Test of heterogeneity I <sup>2</sup>	P
<b>VHL</b>	<b>8,855</b>	2,3,5,6,7,8,11,12,14,15,17,18,20,21,22,23,24,26, 27,28,29,30,31,32,35,36,37,38,39,42,43,44,45,46 ,47,48,49,50,51,53,55,62,63,66,70,79,82,84,92	<b>64 (58-69)</b>	96%	<0.01
<b>PBRM1</b>	<b>6,896</b>	1,2,3,5,6,7,8,12,14,15,16,18, 19,20,21,22,23,24,26,27,28, 29,32,33,36,37,38,42,43,45,47,48,50,51,56	<b>36 (33-38)</b>	72%	<0.01
<b>SETD2</b>	<b>6,163</b>	2,5,6,7,8,11,14,15,16,18,19, 19,20,21,22,23,24,26,27,28,29,32,33,24,26,27 28,29,32,36,37,38,41,43,45,47,48,50,51	<b>20 (16-23)</b>	92%	<0.01
<b>BAP1</b>	<b>6,033</b>	2,3,5,6,7,8,11,14,15,16,18,19, 20,21,22,23,24,26,27,28,29,32,36,37,38,43,45,47 48,51	<b>13 (11-15)</b>	78%	<0.01
<b>MTOR</b>	<b>4,511</b>	2,3,5,8,14,15,17,18,20,22,23,24,26,27,29,32,36,37 43,45,47,48,50	<b>9 (6-12)</b>	89%	<0.01
<b>KDM5C</b>	<b>4,451</b>	2,3,5,7,8,15,18,19,21,22,23,26,27,29,32,36,37,43 45,48,50	<b>10 (8-13)</b>	87%	<0.01
<b>TP53</b>	<b>4,280</b>	3,5,8,11,15,17,19,20,21,22,23,27,32,36,39,45,47, 48,50,51,93	<b>7 (5-9)</b>	79%	<0.01
<b>PTEN</b>	<b>3,720</b>	2,5,8,11,20,21,22,23,27,29,32,36,37,39,45,48,50	<b>7 (4-9)</b>	84%	<0.01
<b>PIK3CA</b>	<b>3,485</b>	2,3,5,8,11,17,22,23,27,29,36,37,45,47,48,51	<b>3 (2-5)</b>	77%	<0.01
<b>TSC1</b>	<b>2,676</b>	2,3,5,8,21,22,23,27,36,37,51,85	<b>5 (3-8)</b>	87%	<0.01
<b>TSC2</b>	<b>2,335</b>	5,11,17,22,23,26,27,29,36,45,85	<b>3 (2-4)</b>	59%	<0.01
<b>TET2</b>	<b>2,163</b>	21,23,26,27,36,37,47,51	<b>3 (2-5)</b>	49%	0.05
<b>ARID1A</b>	<b>1,948</b>	1,3,5,14,18,20,23,26,27,37,45,48,51	<b>2 (1-4)</b>	41%	0.03
<b>ATM</b>	<b>1,429</b>	14,17,23,26,27,29,47	<b>4 (3-6)</b>	33%	0.18
<b>TCEB1</b>	<b>1,401</b>	5,17,23,26,47,48	<b>2 (0.7-3)</b>	44%	0.11
<b>TERT</b>	<b>1,218</b>	17,19,24,26,127,28	<b>7 (3-1.3)</b>	89%	<0.01
<b>CSMD3</b>	<b>1,201</b>	3,5,11,14,20,22,23,43,47,51	<b>8 (6-1.2)</b>	60%	<0.01
<b>NOTCH1</b>	<b>778</b>	17,26,27,51	<b>1 (0.1-3)</b>	56%	0.08
<b>EGFR</b>	<b>583</b>	17,23,27	<b>2 (0-7)</b>	82%	<0.01
<b>EP300</b>	<b>583</b>	17,27,47	<b>5 (3-7)</b>	10%	0.33
<b>NFE2L2</b>	<b>583</b>	23,27,48	<b>2 (0.3-4)</b>	34%	0.22
<b>NF1</b>	<b>523</b>	17,23	<b>4 (2-5)</b>	0%	0.33
<b>POLQ</b>	<b>509</b>	17,45,50	<b>4 (0-1.3)</b>	83%	<0.01
<b>ABCB1</b>	<b>504</b>	11,17	<b>19 (0-79)</b>	99%	<0.01
<b>ROS1</b>	<b>495</b>	3,15,23,27,37,47,51	<b>4 (0.9-86)</b>	73%	<0.01
<b>BRCA2</b>	<b>477</b>	17,27	<b>2 (0-9)</b>	83%	0.02

(continued on next page)

Gene	Sample size	Studies	Mutation prevalence (%) (95% CI)	Test of heterogeneity	
				$I^2$	P
<i>PDGFRA</i>	477	17,27	2 (0-9)	83%	0.02
<i>STAG2</i>	477	27,48	1 (0.4-3)	0%	0.76
<i>MLL3</i>	463	26,27,43,47	5 (3-7)	1%	0.39
<i>ATR</i>	417	17	1 (0.3-2)		
<i>BRCA1</i>	417	17	4 (2-6)		
<b><i>TTN</i></b>	330	6	<b>18 (14-22)</b>		
<i>MLL2</i>	309	26,47	2 (0.8-4)	0%	0.84
<i>NAV3</i>	258	5,23	5 (3-8)	0%	0.47
<i>LRRK2</i>	243	3,23,47	3 (1-6)	0%	0.41
<i>MUC4</i>	228	20,23,47	<b>13 (4-36)</b>	93%	<0.01
<i>TSHZ3</i>	212	23,47	2 (0.3-4)	0%	0.35
<b><i>UGT1A1</i></b>	181	11,37	<b>17 (5-50)</b>	93%	<0.01
<i>KDM6A</i>	166	23,27	4 (1-8)	26%	0.24
<i>ATRX</i>	139	27,45	1 (0-4)	0%	0.82
<i>SF3B1</i>	124	27,29	2 (0.2-6)	0%	0.56
<b><i>CDK12</i></b>	122	20,47	<b>11 (0-50)</b>	91%	<0.01
<i>RPL5</i>	122	20,47	7 (0-31)	83%	0.02
<i>SMC3</i>	106	47	2 (0-7)		
<i>TAF1</i>	106	47	3 (0.6-8)		
<i>USP9X</i>	106	47	2 (0.2-7)		
<i>SMC3</i>	106	47	2 (0-7)		
<b><i>DNMT3A</i></b>	76	20,27	<b>11 (0-40)</b>	83%	0.02
<b><i>CDKN2A</i></b>	60	27	<b>2 (0-9)</b>		
<i>MAP3K1</i>	60	27	2 (0-9)		
<i>NSD1</i>	60	27	2 (0-9)		
<b><i>ERBB3</i></b>	31	3	<b>16 (6-33)</b>		

to 93% using multiple sampling (OR 3.6;  $p < 0.001$ ). This was also true for *KDM5C*, *TP53*, and *PTEN* (Supplementary Table 3).

When we restricted these subgroup analyses (gene analysis method, tumor preservation, and sample numbers) to the 42 articles with high quality scores (8318 samples, 54.6% of all samples), multiple sampling still increased the mutation prevalence values (Supplementary Table 4).

#### 3.4. Some gene mutations expand in RCC metastases

For RCC metastases, a total of 433 samples were analyzed, accounting for five of the 93 studies in this meta-analysis. The data were obtained via single-sample analyses in four out of the five studies. Using a threshold of 1% for mutation prevalence, 31 genes were retained for the final analysis. All of these 31 genes were also identified in primary RCCs. In metastatic samples, the mutation prevalence ranged from 2% to 75%. The four most frequently mutated genes were also *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, and *BAP1*, for which the mutation prevalence was 75%, 41%, 27%, and 18%, respectively (Supplementary Table 5).

When we compared primary tumors to metastases, we observed that the mutation prevalence was significantly more marked for *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, *BAP1*, *KDM5C*, *TP53*, *PTEN*, *TSC1*, *TET2*, and *ARID1A*. For *VHL*, the mutation prevalence increased significantly from 64% in primary tumors to 75% in metastases ( $p < 0.001$ ). By contrast, for *PIK3CA* the mutation prevalence significantly decreased from 3% to 0.5% (Fig. 3A).

Among these 433 samples, a matched primary tumor sample from the same patient was available for only 107 patients, for a total of 124 samples. When we compared primary tumors and metastases across this limited number of patients, there was a nonsignificant increase in mutation prevalence in metastatic compared to primary tumor samples for the most frequently mutated genes, as was the case for all samples in our meta-analysis (Supplementary Fig. 1).

#### 3.5. Loss of heterozygosity and CNAs in primary RCCs and metastases

A total of 51 studies provided data on loss of heterozygosity (LOH) and CNAs.

**Table 2 – Prevalence of common gene mutations in primary renal cell carcinomas according to subgroup analyses**

Gene	Sample size, n (%)	Study IDs <sup>a</sup>	Mutation prevalence, % (95% CI)	p value	Test of heterogeneity I <sup>2</sup> (%)	p value
<b>VHL</b>						
Gene analysis method						
NGS	5167 (58.3)	2, 3, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 36	71 (64–78)	96	<0.01	
Sanger	2502 (28.3)	30, 35, 42, 44, 46, 49, 51, 53, 55, 62, 63, 66, 70, 84	52 (41–63)	<b>0.003</b>	96	<0.01
Target NGS	624 (7.1)	43, 45, 47, 48, 50	67 (53–80)	0.5	84	<0.01
PCR-SSCP	562 (6.3)	79, 82, 73	49 (43–55)	0.054	56	0.1
Tumor preservation conditions <sup>b</sup>						
Frozen	3073 (50.3)	5, 12, 14, 30, 31, 38, 39, 42, 43, 44	62 (52–71)	96	<0.01	
FFPE	3029 (49.7)	2, 3, 6, 7, 8, 11, 15, 17, 20, 22, 23, 24, 35, 37, 46, 55, 62, 6370, 84	64 (56–71)	0.7	95	<0.01
Multiple samples						
No	8510 (96.1)	2, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 15, 17, 18, 21, 22, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 35, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 49, 51, 53, 55, 62, 63, 66, 70, 79, 82, 84, 92	58 (53–63)	95	<0.01	
Yes	345 (3.9)	3, 12, 20, 23, 24, 29, 45, 50	93 (77–100)	<b>&lt;0.001</b>	92	<0.01
Quality assessment						
Good	4848 (54.7)	2, 5, 7, 14, 20, 21, 22, 23, 24, 27, 28, 36, 42, 43, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 62, 63, 79, 84	66 (59–73)	98	<0.01	
Other	4007 (45.3)	3, 6, 8, 11, 12, 15, 17, 18, 26, 29, 30, 31, 32, 35, 37, 38, 39, 44, 46, 53, 55, 66, 70, 82, 92	61 (52–70)	0.3	96	<0.01
<b>PBRM1</b>						
Gene analysis method						
NGS	5836 (84.6)	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 14, 15, 16, 18, 19	37 (34–39)	73	<0.01	
Target NGS	588 (8.5)	12, 21, 37, 38	35 (25–46)	0.8	71	<0.01
Sanger	472 (6.9)	42, 51, 56	30 (22–37)	0.085	65	0.06
Tumor preservation conditions <sup>b</sup>						
Frozen	1490 (43.3)	5, 12, 14, 38, 42, 43, 45, 48, 50, 51	33 (30–38)	55	0.02	
FFPE	1944 (56.6)	1, 2, 3, 6, 7, 8, 15, 16, 19, 20, 22, 23	39 (34–44)	0.7	76	<0.01
Multiple samples						
No	6551 (95.0)	1, 2, 5, 6, 7, 8, 14, 15, 16, 18, 19, 21	35 (34–36)	70	<0.01	
Yes	345 (5.0)	3, 12, 20, 23, 24, 29, 45, 50	42 (33–54)	<b>0.043</b>	76	<0.01
Quality assessment						
Good	4885 (70.8)	1, 2, 5, 7, 14, 19, 29, 21, 22, 23, 24, 27, 36, 42, 43, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 56	37 (34–40)	74	<0.01	
Other	2011 (29.2)	3, 6, 8, 12, 15, 16, 18, 26, 29, 32, 33, 37, 38	32 (28–36)	0.11	58	<0.01
<b>SETD2</b>						
Gene analysis method						
NGS	5479 (88.9)	2, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 32, 36, 41, 43, 45, 47, 48, 50	20 (16–24)	92	<0.01	
Target NGS	586 (9.5)	21, 37, 38	25 (20–31)	0.5	36	0.19
Sanger	98 (1.6)	51	04 (1–10)	<b>0.049</b>		
Tumor preservation conditions <sup>b</sup>						
Frozen	1371 (43.1)	5, 14, 38, 43, 45, 48, 50, 51	19 (11–28)	92	<0.01	
FFPE	1811 (56.9)	2, 6, 7, 8, 11, 15, 16, 19, 20, 22, 23, 37	23 (16–31)	0.9	92	<0.01
Multiple samples						
No	5810 (94.9)	2, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 15, 16, 18, 19, 21, 22, 26, 27, 28, 32, 36, 37, 38, 41, 43, 47, 48, 51	16 (13–19)	89	<0.01	
Yes	312 (5.1)	20, 23, 24, 29, 45, 50	46 (26–67)	<b>&lt;0.001</b>	92	<0.01
Quality assessment						
Good	4646 (74.4)	2, 5, 7, 14, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 27, 28, 36, 41, 43, 45, 47, 48, 50, 51	23 (18–28)	74	<0.01	
Other	1517 (24.6)	6, 8, 11, 15, 16, 18, 26, 29, 32, 37, 38	13 (8–18)	<b>0.022</b>	58	<0.01
<b>BAP1</b>						
Gene analysis method						
NGS	5349 (88.7)	2, 3, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 15, 16, 18, 19	13 (11–16)	81	<0.01	
Target NGS	586 (9.7)	21, 37, 38	13 (10–16)	0.7	0	0.9
Sanger	98 (1.6)	51	9 (4–17)	0.4		
Tumor preservation conditions <sup>b</sup>						
Frozen	1534 (45.4)	5, 14, 38, 43, 45, 48, 51	11 (9–14)	56	0.02	
FFPE	1842 (54.6)	2, 3, 6, 7, 8, 11, 15, 16, 19, 20, 22, 23, 24, 37	16 (11–21)	0.3	85	<0.01

(continued on next page)

**Table 2 (continued)**

Gene	Sample size, n (%)	Study IDs <sup>a</sup>	Mutation prevalence, % (95% CI)	$\chi^2$ (%)	Test of heterogeneity p value
Multiple samples					
No	5703 (94.5)	2, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 16, 18, 19, 21, 22, 26, 27, 28, 32, 36, 37, 38, 43, 47, 48, 51	12 (10–14)	75	<0.01
Yes	330 (5.5)	3, 20, 23, 24, 29, 45	24 (20–29)	0	2.69
Quality assessment					
Good	4485 (74.3)	2, 5, 7, 14, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 27, 28, 36, 43, 45, 47, 48, 51	14 (12–17)	76	<0.01
Other	1548 (25.7)	3, 6, 8, 11, 15, 16, 18, 26, 29, 32, 37, 38	11 (7–15)	0.2	<0.01

NGS = next-generation sequencing; FFPE = formalin-fixed paraffin-embedded; PCR-SSCP = polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism; CI = confidence interval.

<sup>a</sup> Study ID numbers refer to the studies listed in Supplementary Table 1, for which the publication details are provided in the supplementary reference list.

<sup>b</sup> Adjusted for methods to detect gene mutation.

For primary RCCs (total of 6018 samples and 4994 patients), LOH and CNA prevalence ranged from 5% to 99%. The four chromosome losses that were most frequently identified were 3p25.3, 4q, 6q22.33, and 8p23.2, with prevalence rates of 85%, 41%, 34%, and 34% respectively (*Supplementary Fig. 2*). The four most frequently identified chromosome gains were 5q35.3, 7q22.3, 8q24.21, and 20q13.33 with prevalence rates of 71%, 54%, 35%, and 44% respectively. In addition, a 3p LOH was reported in 86% of cases. For RCC metastases, a total of 307 samples were analyzed for 227 patients; the LOH and CNA mutation prevalence rates ranged from 5% to 99%. The four most frequent chromosome losses were 3p25.3, 9p21.3, 3p, and 9, with prevalence rates of 85%, 76%, 64%, and 34% respectively (*Supplementary Fig. 2*). The four most frequent chromosome gains were 1q21.3, 7q36.3, 20q11.21, and 5, with prevalence rates of 61%, 57%, 50%, and 34% respectively. In addition, 3p LOH was reported in 19% of cases, but this was for a small number of samples ( $n = 32$ ).

Comparison of primary RCCs and metastases revealed a significant increase in the prevalence of losses for chromosomes 1p36.11, 9p21.3, and 18, and of gains for chromosomes 1q21.3, 7q36.3, 8q, and 20q11.21. By contrast, chromosome 3p loss significantly decreased from 84% in primary tumors to 64% in metastases (*Fig. 3B*). In particular, *ARID1A*, located at the 1p36.11 locus and lost in 54% of metastatic RCCs, was also more frequently mutated in metastases compared to primary RCCs (10% vs. 1.7%;  $p = 0.019$ ; *Fig. 3A*). *CDKN2A*, also called *p16*, is located at the 9p21.3 locus and was lost in 76% of metastatic samples. By contrast, we observed a copy-number gain for *SETDB1* located at 1q21.3 and amplified in 61% of metastatic RCCs. Both *p16* loss and *SETDB1* amplification are involved in cell cycle progression (*Fig. 4D*). *ASXL1*, located at 20p11.21 and amplified in 50% of metastatic RCCs compared to 21% of primary tumors ( $p < 0.001$ ), is closely linked to *BAP1* function (*Fig. 4B*).

### 3.6. Heterogeneity of mutation prevalence

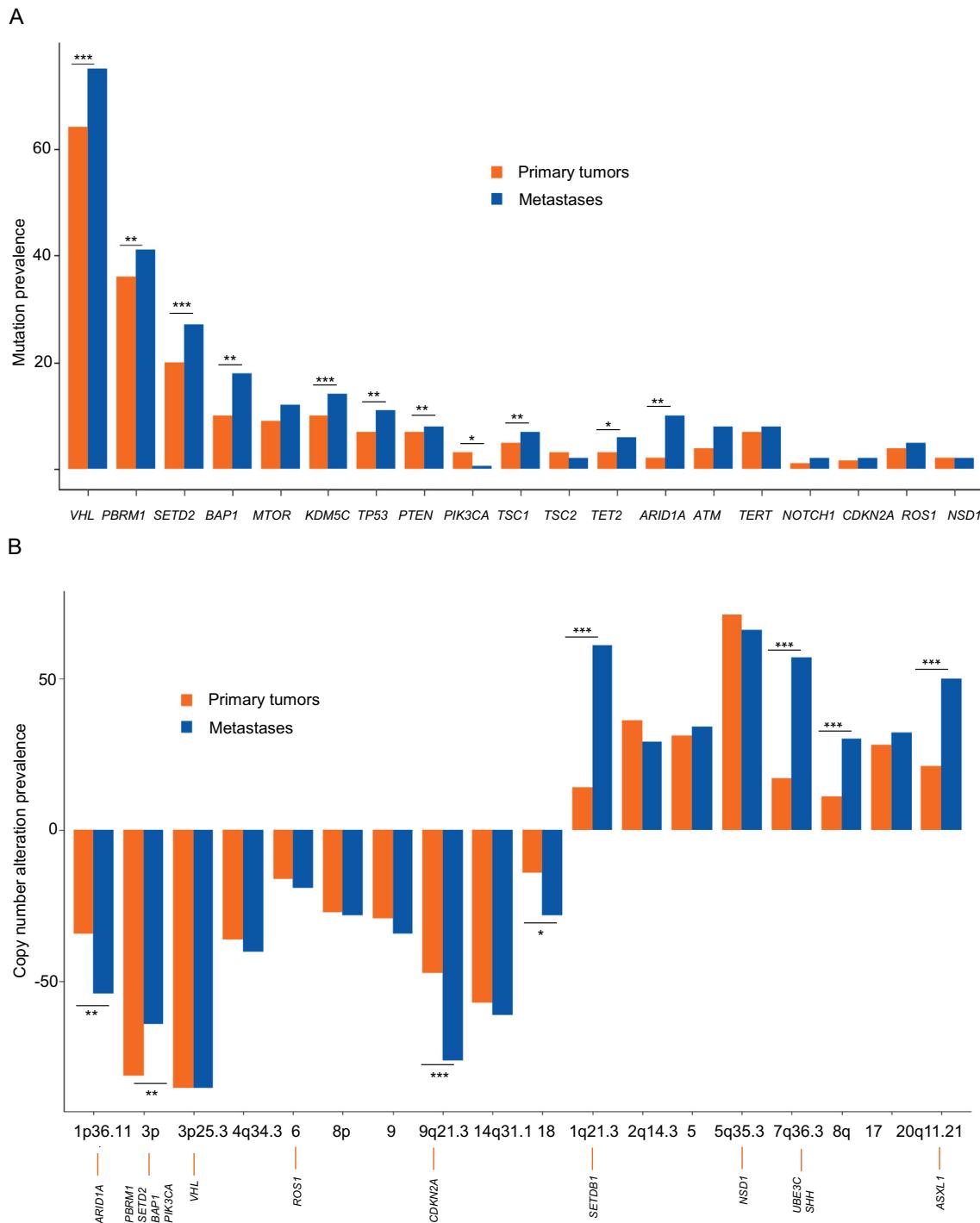
Given the heterogeneity of mutation prevalence among primary tumors, we used the random effect to express the overall prevalence for each gene analyzed. We then sought to understand the reasons for heterogeneity and performed various subgroup analyses for primary tumor samples: the studies remained heterogeneous. By contrast, when we only considered metastatic samples, there was no heterogeneity across studies for the 24 genes analyzed, except for *PTEN*, *TET2*, and *TSC2*.

### 3.7. Discussion

We report here the first meta-analysis of genomic data from RCCs. The meta-analysis provides more reliable results for gene mutation prevalence than data obtained from individual sources.

The four most frequently mutated genes were *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, and *BAP1*.

*VHL* is a tumor suppressor gene located on chromosome 3p. It was mutated in 93% of primary RCCs in the case of studies involving multiple sampling and is thus at the core



**Fig. 3 – Pooled proportion of gene mutations in primary tumors and metastases from 14 696 patients with renal cell carcinoma.** \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ .

of RCC carcinogenesis (Fig. 4A). The VHL protein is the substrate recognition component for the E3 ligase complex, including TCEB1 and CUL2. TCEB1, also called ELOC (Elongin-C), is located on chromosome 8q21.11 and was mutated in 2% of cases or lost in up to 19% of cases in our meta-analysis; thus, TCEB1 could participate in inactivation of the VHL complex in RCC carcinogenesis [11]. The VHL complex targets the  $\alpha$  subunits of the hypoxia-inducible factors HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  for ubiquitin-mediated degrada-

tion [12]. In cases of VHL inactivation (mutation, 3p loss, hypermethylation) or mutation of the VHL complex members, HIF1 $\alpha$  accumulates in the cytoplasm and forms heterodimers with HIF1 $\beta$ , which acts as a potent transcriptional proangiogenic factor in RCC carcinogenesis [12].

The three other most frequently mutated genes, PBRM1, SETD2, and BAP1, are also located on chromosome 3p. All three are chromatin modifiers, contributing to DNA repair

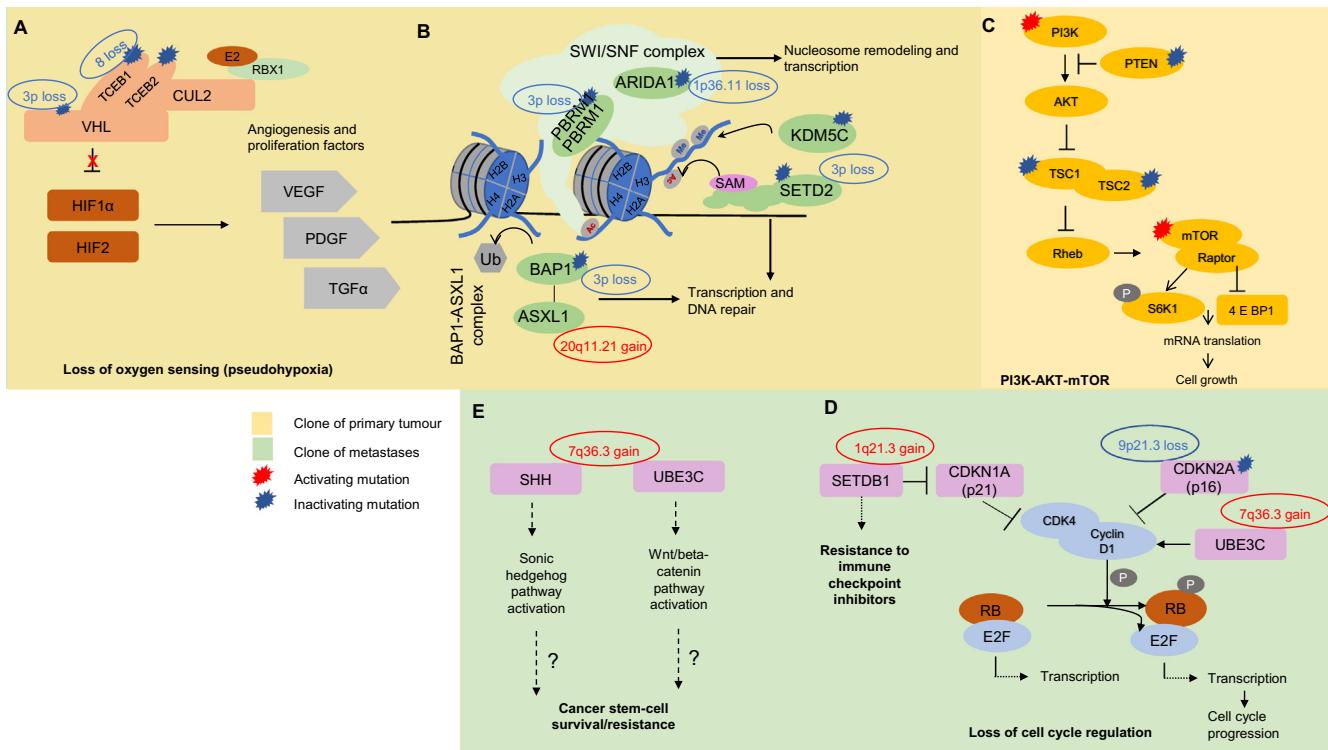


Fig. 4 – Main gene alterations and signaling pathways involved in carcinogenesis in clear-cell renal cell carcinoma.

and transcriptional regulation (Fig. 4B). These are early events in RCC carcinogenesis, and loss of these genes favors genetic instability. Mutations in *BAP1* and *PBRM1* are usually exclusive [13]. *PBRM1* encodes the chromatin-targeting subunit BAF180 in the ATP-dependent SWI/SNF chromatin remodeling complex, implicated in proliferation, replication, transcription, and DNA repair [14]. Besides chromatin remodeling, histone modifications could also play a critical role [15]. *SETD2* (the SET domain containing protein 2) is a methyltransferase responsible for trimethylation of lysine 36 residues on histone H3 (ie, H3K36me3), which in turn is involved in regulating transcription and mediating DNA damage repair [16]. *BAP1* is a nuclear-localized deubiquitinating enzyme and a tumor suppressor protein; its function is to deubiquitinate the transcriptional regulator HCF1 implicated in chromatin remodeling, with additional roles in regulation of E2F family transcription factors and downstream cell-cycle regulation. Therefore, loss of *BAP1* leads to cell proliferation and tumorigenesis [17].

In our meta-analysis, seven other genes reached a mutation prevalence of >10%, but were only identified in a limited number of studies (one study for *TTN* and *ERBB3*, two studies for *ABCB1*, *CDK12*, *DNMT3A*, and *UTGA1*, and three studies for *MUC4*). *ABCB1*, located on 7q21.1, encodes P-glycoprotein, which is a major drug transporter. Zhang et al [18] observed a 50% mutation prevalence for *ABCB1* in RCCs from 87 Chinese patients. In a study by Li et al [19], the *ABCB1* mutation prevalence was only 2% in 417 RCCs from The Cancer Genome Atlas. A similar observation was made for the two studies assessing the prevalence of

*UGT1A1*. These high mutation prevalence rates for *ABCB1* and *UGT1A1* in RCCs obtained from Chinese patients could be attributable to the genetics of the population.

An important result from our meta-analysis is that formalin-fixed samples provided reliable data on gene mutation prevalence, confirming that they are suitable for sequencing in routine practice. However, one should bear in mind that formalin fixation could lead to underdetection of some abnormalities because of conformational DNA changes and DNA breaks [20]. Frozen samples should remain the gold standard for research purposes [21].

Our meta-analysis also confirmed the added value of using multiple-sample sequencing to avoid underestimation of mutation prevalence as a result of tumor heterogeneity. Indeed, primary RCCs usually comprise clonal, subclonal, and private mutations, challenging mutation detection for minority clones [22]. Our meta-analysis confirmed that sequencing from several distinct regions of a primary tumor increased the robustness of clonal mutation detection, and this was particularly true for the four most frequently mutated genes (*VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, and *BAP1*). Surprisingly, we did not identify any significant mutation prevalence for most variants, and this could be a limitation in our meta-analysis. In our meta-analysis, only eight of the 93 studies that we included conducted multiple-sample analyses, corresponding to 169 patients (1.1% of the total number of patients in this meta-analysis) and 345 samples. This discrepancy for low-prevalence variants could be linked to insufficient coverage for some mutations [22], with a risk of underestimating the detection of subclonal or private mutations. An alternative method to multiple

sampling, the Req-Seq method, which pools samples from the same tumor in a single analysis, seems a promising approach [23].

One strength of our meta-analysis is that we compared genomic data obtained from primary RCCs and metastases. This is of major importance, since metastatic cells can derive from minority clones within the primary tumor [24]. Our meta-analysis revealed that all genetic alterations identified in metastatic samples had already been identified in the primary tumors, but with some significant variations that have prognostic and therapeutic implications. Alterations in the *VHL* gene seem not to have prognostic value, or to predict response to antiangiogenic tyrosine kinase inhibitors (TKIs) [25]. In fact, *VHL* expression is almost constantly lost in metastatic clear-cell RCCs when all possible alterations are considered (3p loss and mutations found in almost 90% of patients in our meta-analysis, and epigenetic silencing with *VHL* promoter hypermethylation in 8% of patients with RCCs) [26]. While this was not the focus of our meta-analysis, epigenetic modifications have major implications in RCC carcinogenesis. A subgroup of 37% of clear cell RCCs with increased DNA hypermethylation can be identified, which is associated with *SETD2* mutations, metastatic stage, and shorter survival [27]. The list of tumor-related genes silenced by DNA hypermethylation has been increasing, which opens translational research perspectives in gene therapy.

*PBRM1*, *BAP1*, *SETD2*, *KDM5C*, and *TP53* have been studied for a link between gene alterations and response to treatment. *PBRM1* loss of function seems predictive of response to antiangiogenic TKIs and could thus be associated with better prognosis among patients with metastatic disease [28–31], whereas *PBRM1* mutations are associated with metastatic risk and poorer prognosis in localized disease [32]. Regarding checkpoint inhibitors, despite limited data and some contradictory results, it seems that treatment with nivolumab is associated with better survival among patients with *PBRM1* mutations [31,33–35]. In fact, *PBRM1*, *SETD2*, *BAP1*, *TP53*, and *KDM5C* mutations could be associated with different immune infiltrate patterns in the tumor, explaining different patterns of responses to immunotherapies depending on the mutational status [36]. As in the case of *PBRM1*, mutations in *BAP1* and *TP53* could be linked to metastatic risk [24,37]. However, their loss of function is also associated with resistance to antiangiogenic TKIs [29,30]. Further studies are required to confirm these promising results with potential for better tailoring of the treatment of metastatic RCC. A new classification in four groups has been developed in which the mutational status of *BAP1*, *TP53*, and *PBRM1* is integrated. This new genetically annotated classification is more discriminant than the clinical-biological classification [38] and could be used for future clinical trials in metastatic RCC. The mutational status of *BAP1*, *TP53*, and *PBRM1* in primary tumors could also be integrated to guide therapeutic decisions in the adjuvant setting when treatment with sunitinib is required [39].

Two other genes involved in the *PBRM1*-*SETD2*-*BAP1* signaling pathway were much more frequently altered in metastases compared to the primary tumors: *ASXL1* was amplified in 50% of cases and *ARID1A* was lost in 54% of

metastatic RCCs. *ASXL1*, located on chromosome 20p11.21, is the regulatory subunit of a deubiquitinase complex, for which the catalytic subunit is *BAP1*. *ARID1A*, located on 1p36.11, encodes different subunits of the SWI/SNF complex. Our results suggesting a role of *ARID1A* loss in driving metastatic progression of RCCs concur with the observation of frequent underexpression of *ARID1A* in 404 primary RCCs, itself associated with poor prognosis [40,41]. *ARID1A* mutations frequently occur in ovarian and gastric cancers, and *ARID1A* function loss is also associated with poor prognosis in these other cancer types [42].

By contrast, our meta-analysis revealed that *PIK3CA* mutation prevalence decreased significantly in metastatic RCC compared to primary tumors. This could be counterintuitive, as *PIK3CA* mutations are associated with metastatic spread in other cancer types such as breast cancer [43]. In fact, the PIK3CA-AKT-mTOR pathway is frequently altered in RCCs, in 25–30% of primary tumors and metastases (Fig. 4C). Typically, we showed that the decrease in *PIK3CA* mutation prevalence was potentially compensated by a significant increase in *mTOR* mutation prevalence (from 9% in primary tumors to 12% in metastases). Activating mutations in the mTOR pathway, including *MTOR*, *TSC1*, *TSC2*, *NF1*, and *PIK3CA* mutations, seem to be associated with greater sensitivity to everolimus [44]. mTOR inhibitors are still currently approved for the treatment of metastatic RCCs, but with low benefit [45]. Their prescription could be reappraised in light of mutational status.

*SHH* and *UBE3C*, located on 7q36.3 (Fig. 4E), were amplified in 57% of metastatic RCCs compared to 17% of primary RCCs in our meta-analysis. *SHH* [46] and *UBE3C* [47] overexpression, through activation of sonic hedgehog and Wnt/β-catenin pathways, respectively, could be associated with cancer stem-cell maintenance, itself known to be associated with drug resistance and metastasis progression [48,49].

*CDKN2A*, also called *p16* and lost in 76% of metastatic RCCs in our meta-analysis, and *SETDB1*, amplified in 61% of metastatic RCCs, are typically linked to the metastatic signature (Fig. 4D). *p16* has an inhibitory effect on *CDK4* and cyclin D1, which are both factors that drive the cell cycle and play a key role in the metastatic progression of various malignant tumors. *SETDB1*, through *CDKN1A/p21* inhibition, activates the complex *CDK4/cyclin D1*. *CDK4/6* inhibitors are currently approved for the treatment of metastatic breast cancer [50,51]. Palbociclib is currently being evaluated in clinical trials using tumor sequencing for personalized treatment of various cancers, including metastatic renal cancer. Similar personalized clinical trials could also be useful to assess the benefit of targeting rare mutations when a specific drug is available. In addition, *SETDB1* expression seems to be closely linked to resistance to immune checkpoint inhibitors such as nivolumab and pembrolizumab [52], and thus could be a promising target for treatment of metastatic RCC.

Our meta-analysis has some limitations. It was performed on published data and not individual data. For this reason, some subgroup analyses could not be performed because of missing data (data for systemic treatments, age, gender, and ethnicity). In addition, there were limited

data on paired samples (primary tumors and metastases from the same patients) and on tumor mutational burden (TMB), thus limiting reliable analyses. TMB, which partly reflects gene abnormalities in a tumor, has been considered as a biomarker predictive of response to immune checkpoint inhibitors [53], while the data remain controversial for metastatic clear-cell RCCs [54]. This is particularly true for the clonal TMB (ie, the number of mutations estimated to be present in every cancer cell), but probably not for the subclonal TMB [23]. In addition, single sampling could overestimate TMB in a tumor when compared to multiple sampling. In our meta-analysis, only two studies assessed TMB, neither of which used multiple sampling [18,37]. Some prevalence values for gene alterations should be interpreted with caution when they only concern a few studies and thus limited numbers of patients.

Another limitation of our meta-analysis is the heterogeneity of studies for our analysis of primary tumors, despite various subgroup analyses to address this limitation. By contrast, for metastatic samples there was no heterogeneity across studies for the 24 genes studied, except for *PTEN*, *TET2*, and *TSC2*. This is a major result of our meta-analysis, since micrometastatic and macrometastatic clones are the ones we need to eradicate with medical treatments. This highlights the need to preferentially biopsy metastases for genomic studies, and not just the primary tumor, when this is possible.

#### 4. Conclusions

This is the first meta-analysis of genomic alterations in clear cell RCC and shows significant differences in the prevalence of gene alterations between primary tumors and metastases, with the added value of using multiple sampling to identify these alterations more accurately.

Our results underline the added value of biopsies of RCC metastases to fully explore the biology of metastatic disease for therapeutic purposes. In the adjuvant setting with potential micrometastatic disease, genomic data for primary tumors could also be useful for decisions on whether to initiate adjuvant treatment.

**Author contributions:** Guilhem Bousquet had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

**Study concept and design:** Bousquet, Pamoukdjian, Bui.

**Acquisition of data:** Bui, Bousquet.

**Analysis and interpretation of data:** Bui, Dao, Nguyen, Pamoukdjian, Feugeas, Bousquet.

**Drafting of the manuscript:** Bui, Bousquet.

**Critical revision of the manuscript for important intellectual content:** Feugeas.

**Statistical analysis:** Bui, Pamoukdjian, Bousquet.

**Obtaining funding:** Bousquet.

**Administrative, technical, or material support:** Bousquet.

**Supervision:** Bousquet.

**Other:** None.

**Financial disclosures:** Guilhem Bousquet certifies that all conflicts of interest, including specific financial interests and relationships and affiliations relevant to the subject matter or materials discussed in the manuscript (eg, employment/affiliation, grants or funding, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, royalties, or patents filed, received, or pending), are the following: None.

**Funding/Support and role of the sponsor:** This study was supported by Bourse d'Excellence de l'Ambassade de France au Viet Nam (grant number 971522C) and INSERM. The sponsors played a role in the design and conduct of the study; data collection, management, analysis, and interpretation; and preparation, review, and approval of the manuscript.

**Acknowledgments:** We thank Ms. Angela Swaine and Sarah Leyshon for revision of the English language.

#### Peer Review Summary

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2021.12.010>.

#### References

- [1] Padala SA, Barsouk A, Thandria KC, et al. Epidemiology of renal cell carcinoma. *World J Oncol* 2020;11:79–87. <https://doi.org/10.14740/wjon1279>.
- [2] van der Poel HG, Mulders PF, Oosterhof GO, et al. Prognostic value of karyometric and clinical characteristics in renal cell carcinoma. Quantitative assessment of tumor heterogeneity. *Cancer* 1993;72:2667–74. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19931101\)72:9<2667::aid-cncr2820720924>3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19931101)72:9<2667::aid-cncr2820720924>3.0.co;2-0).
- [3] Giuliani L, Giberti C, Martorana G, Rovida S. Radical extensive surgery for renal cell carcinoma: long-term results and prognostic factors. *J Urol* 1990;143:468–73. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)39992-5](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)39992-5).
- [4] Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893–917. <https://doi.org/10.1002/ijc.25516>.
- [5] Volpe A, Patard JJ. Prognostic factors in renal cell carcinoma. *World J Urol* 2010;28:319–27. <https://doi.org/10.1007/s00345-010-0540-8>.
- [6] Pirrotta MT, Bernardeschi P, Fiorentini G. Targeted-therapy in advanced renal cell carcinoma. *Curr Med Chem* 2011;18:1651–7. <https://doi.org/10.2174/092986711795471293>.
- [7] Makhov P, Joshi S, Ghatalia P, Kutikov A, Uzzo RG, Kolenko VM. Resistance to systemic therapies in clear cell renal cell carcinoma: mechanisms and management strategies. *Mol Cancer Ther* 2018;17:1355–64. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-1299>.
- [8] Beksac AT, Paulucci DJ, Blum KA, Yadav SS, Sfakianos JP, Badani KK. Heterogeneity in renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2017;35:507–15. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2017.05.006>.
- [9] Stewart LA, Clarke M, Rovers M, et al. Preferred Reporting Items for a Systematic Review and Meta-analysis of Individual Participant Data: the PRISMA-IPD statement. *JAMA* 2015;313:1657. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.3656>.
- [10] Sohani ZN, Meyre D, de Souza RJ, et al. Assessing the quality of published genetic association studies in meta-analyses: the quality of genetic studies (Q-Genie) tool. *BMC Genet* 2015;16:50. <https://doi.org/10.1186/s12863-015-0211-2>.
- [11] Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, et al. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat Genet* 2013;45:860–7. <https://doi.org/10.1038/ng.2699>.
- [12] Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest* 2013;123:3664–71. <https://doi.org/10.1172/JCI67230>.
- [13] Peña-Llopis S, Vega-Rubín-de-Celis S, Liao A, et al. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nat Genet* 2012;44:751–9. <https://doi.org/10.1038/ng.2323>.
- [14] Reisman D, Glaros S, Thompson EA. The SWI/SNF complex and cancer. *Oncogene* 2009;28:1653–68. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.4>.

- [15] Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA. Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat Biotechnol* 2010;28:1069–78. <https://doi.org/10.1038/nbt.1678>.
- [16] Sun X-J, Wei J, Wu X-Y, et al. Identification and characterization of a novel human histone H3 lysine 36-specific methyltransferase. *J Biol Chem* 2005;280:35261–71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504012200>.
- [17] Gallan AJ, Parilla M, Segal J, Ritterhouse L, Antic T. BAP1-mutated clear cell renal cell carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2021;155:718–28. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa176>.
- [18] Zhang S, Wang B, Zhang F, Ye J, Ge L, Ma L. Genomic alterations of renal cell carcinoma and clinical implications in the Chinese population. *Med Sci Monit* 2019;25:2959–65. <https://doi.org/10.12659/MSM.914493>.
- [19] Li J, Guo L, Chai L, Ai Z. Comprehensive analysis of driver genes in personal genomes of clear cell renal cell carcinoma 153303381983096. *Technol Cancer Res Treat* 2019;18. <https://doi.org/10.1177/1533033819830966>.
- [20] Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 2002;161:1961–71. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64472-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64472-0).
- [21] Gaffney E, Riegman P, Grizzle W, Watson P. Factors that drive the increasing use of FFPE tissue in basic and translational cancer research. *Biotech Histochem* 2018;93:373–86. <https://doi.org/10.1080/10520295.2018.1446101>.
- [22] Pongor LS, Munkácsy G, Vereczkey I, Pete I, Győrffy B. Currently favored sampling practices for tumor sequencing can produce optimal results in the clinical setting. *Sci Rep* 2020;10:14403. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71382-3>.
- [23] Litchfield K, Reading JL, Puttik C, et al. Meta-analysis of tumor- and T cell-intrinsic mechanisms of sensitization to checkpoint inhibition 596–614.e14. *Cell* 2021;184. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.002>.
- [24] Bousquet G, El Bouchtaoui M, Leboeuf C, et al. Tracking sub-clonal TP53 mutated tumor cells in human metastatic renal cell carcinoma. *Oncotarget* 2015;6:19279–89. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4220>.
- [25] Kim JH, Kim HS, Kim BJ. Prognostic value of KRAS mutation in advanced non-small-cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors: a meta-analysis and review. *Oncotarget* 2017;8:48248–52. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17594>.
- [26] Nickerson ML, Jaeger E, Shi Y, et al. Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. *Clin Cancer Res* 2008;14:4726–34. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4921>.
- [27] Ricketts CJ, De Cubas AA, Fan H, et al. The Cancer Genome Atlas comprehensive molecular characterization of renal cell carcinoma 313–26.e5. *Cell Rep* 2018;23. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.075>.
- [28] Ho TH, Choueiri TK, Wang K, et al. Correlation between molecular subclassifications of clear cell renal cell carcinoma and targeted therapy response. *Eur Urol Focus* 2016;2:204–9. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2015.11.007>.
- [29] Fay AP, de Velasco G, Ho TH, et al. Whole-exome sequencing in two extreme phenotypes of response to VEGF-targeted therapies in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *J Natl Compr Cancer Netw* 2016;14:820–4. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2016.0086>.
- [30] Voss MH, Reising A, Cheng Y, et al. Genomically annotated risk model for advanced renal-cell carcinoma: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol* 2018;19:1688–98. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30648-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30648-X).
- [31] McDermott DF, Husen MA, Atkins MB, et al. Clinical activity and molecular correlates of response to atezolizumab alone or in combination with bevacizumab versus sunitinib in renal cell carcinoma. *Nat Med* 2018;24:749–57. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0053-3>.
- [32] Carril-Ajuria L, Santos M, Roldán-Romero JM, Rodriguez-Antona C, de Velasco G. Prognostic and predictive value of PBRM1 in clear cell renal cell carcinoma. *Cancers* 2019;12:E16. <https://doi.org/10.3390/cancers12010016>.
- [33] Braun DA, Ishii Y, Walsh AM, et al. Clinical validation of PBRM1 alterations as a marker of immune checkpoint inhibitor response in renal cell carcinoma. *JAMA Oncol* 2019;5:1631–3. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.3158>.
- [34] Braun DA, Hou Y, Bakouny Z, et al. Interplay of somatic alterations and immune infiltration modulates response to PD-1 blockade in advanced clear cell renal cell carcinoma. *Nat Med* 2020;26:909–18. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0839-y>.
- [35] Bi K, He MX, Bakouny Z, et al. Tumor and immune reprogramming during immunotherapy in advanced renal cell carcinoma e5. *Cancer Cell* 2021;39:649–61. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.02.015>.
- [36] Chakiryan NH, Hajiran A, Kim Y, et al. Correlating immune cell infiltration patterns with recurrent somatic mutations in advanced clear cell renal cell carcinoma. *Eur Urol Focus*. In press. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2021.04.014>.
- [37] Hakimi AA, Attalla K, DiNatale RG, et al. A pan-cancer analysis of PBAF complex mutations and their association with immunotherapy response. *Nat Commun* 2020;11:4168. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17965-0>.
- [38] Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, Russo P, Mazumdar M. Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2002;20:289–96. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.1.289>.
- [39] Ravaud A, Motzer RJ, Pandha HS, et al. Adjuvant sunitinib in high-risk renal-cell carcinoma after nephrectomy. *N Engl J Med* 2016;375:2246–54. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611406>.
- [40] Girgis AH, Iakovlev VV, Beheshti B, et al. Multilevel whole-genome analysis reveals candidate biomarkers in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2012;72:5273–84. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0656>.
- [41] Lichner Z, Scorilas A, White NMA, et al. The chromatin remodeling gene ARID1A is a new prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2013;182:1163–70. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.01.007>.
- [42] Wu JN, Roberts CWM. ARID1A mutations in cancer: another epigenetic tumor suppressor? *Cancer Discov* 2013;3:35–43. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0361>.
- [43] Bertucci F, Finetti P, Guille A, et al. Comparative genomic analysis of primary tumors and metastases in breast cancer. *Oncotarget* 2016;7:27208–19. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8349>.
- [44] Lim SM, Park HS, Kim S, et al. Next-generation sequencing reveals somatic mutations that confer exceptional response to everolimus. *Oncotarget* 2016;7:10547–56. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7234>.
- [45] Hasskarl J. Everolimus. In: Martens U, editor. Small molecules in oncology. Recent results in cancer research, vol. 211. Cham, Switzerland: Springer; 2018. p. 101–23. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-91442-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-91442-8_8).
- [46] Kotulak-Chrzaszcz A, Klacz J, Matuszewski M, Kmiec Z, Wierzbicki P. Expression of the Sonic Hedgehog pathway components in clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Lett* 2019;18:5801–10. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10919>.
- [47] Wen JL, Wen XF, Li RB, et al. UBE3C promotes growth and metastasis of renal cell carcinoma via activating Wnt/β-catenin pathway. *PLoS One* 2015;10:e0115622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115622>.
- [48] Bousquet G, El Bouchtaoui M, Sophie T, et al. Targeting autophagic cancer stem-cells to reverse chemoresistance in human triple negative breast cancer. *Oncotarget* 2017;8:35205–21. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16925>.
- [49] Varma M, Gapihan G, Feugeas J-P, et al. Stem cells increase in numbers in perinecrotic areas in human renal cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21:916–24. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0666>.
- [50] Chen D, Sun X, Zhang X, Cao J. Inhibition of the CDK4/6-cyclin D-Rb pathway by ribociclib augments chemotherapy and immunotherapy in renal cell carcinoma. *BioMed Res Int* 2020;2020:9525207. <https://doi.org/10.1155/2020/9525207>.
- [51] Turner NC, Slamon DJ, Ro J, et al. Overall survival with palbociclib and fulvestrant in advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2018;379:1926–36. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1810527>.
- [52] Griffin GK, Wu J, Iracheta-Vellve A, et al. Epigenetic silencing by SETDB1 suppresses tumour intrinsic immunogenicity. *Nature* 2021;595:309–14. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03520-4>.
- [53] Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2019;19:133–50. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0116-x>.
- [54] Raimondi A, Sepe P, Zattarin E, et al. Predictive biomarkers of response to immunotherapy in metastatic renal cell cancer. *Front Oncol* 2020;10:1644. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01644>.

CORRESPONDENCE

Open Access



# Metastatic clear-cell renal cell carcinoma: a frequent NOTCH1 mutation predictive of response to anti-NOTCH1 CB-103 treatment

Thi Oanh Bui<sup>1,2,3</sup>, Eurydice Angeli<sup>2,4</sup>, Morad El Bouchtaoui<sup>2</sup>, Guillaume Gapihan<sup>2</sup>, Van Tu Dao<sup>1,2,3</sup>, Justine Paris<sup>2</sup>, Christophe Leboeuf<sup>2</sup>, Michael Soussan<sup>2,4,5</sup>, Patrick Villarese<sup>6</sup>, Marianne Ziol<sup>4,7</sup>, Emmanuel Van Glabeke<sup>8</sup>, Thi Huong Le<sup>3</sup>, Jean-Paul Feugeas<sup>9,10</sup>, Anne Janin<sup>2</sup> and Guilhem Bousquet<sup>2,4,11\*</sup>

## Abstract

**Background** Clear-cell renal cell carcinomas (ccRCCs) are malignant tumors with high metastatic potential and resistance to treatments occurs almost constantly. Compared to primary tumors, there are still limited genomic data that has been obtained from metastatic samples.

**Methods** We aimed to characterize metastatic ccRCC by way of whole-genome analyses of metastatic formalin-fixed samples, using OncoScan® technology. We identified a frequent, unexpected pL1575P NOTCH1 mutation which we set out to characterize for translational purposes. We thus implemented patient-derived xenografts from metastatic samples of human ccRCC to explore its clinical significance.

**Results** We showed that pL1575P NOTCH1 mutation was an activating mutation, leading to the expression of NOTCH1-intracellular domain-active fragments in both cancer cells and tumor endothelial cells, suggesting a trans-differentiation of cancer cells into tumor micro-vessels. We demonstrated that this mutation could be used as a predictive biomarker of response to CB-103, a specific NOTCH1-intracellular domain inhibitor. One striking result was the considerable anti-angiogenic effect, coherent with the presence of NOTCH1 mutation in tumor micro-vessels.

**Conclusions** We identified a frequent, unexpected pL1575P\_c4724T\_C NOTCH1 mutation as a new biomarker for ccRCC metastases, predictive of response to the CB103 NOTCH1-intracellular domain inhibitor.

**Keywords** NOTCH1 mutation, Metastatic clear-cell renal cell carcinoma, Anti-NOTCH1 treatment, CB-103, Biomarker

\*Correspondence:  
Guilhem Bousquet  
guilhem.bousquet@aphp.fr

<sup>1</sup> National Cancer Hospital, Cancer Research and Clinical Trials Center, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup> Université Paris Cité, INSERM, UMR\_S942 MASCOT, F-75006 Paris, France

<sup>3</sup> Hanoi Medical University, Hanoi, Vietnam

<sup>4</sup> Université Sorbonne Paris Nord, 93439 Villetteuse, France

<sup>5</sup> Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Avicenne, Service de Médecine Nucléaire, 93000 Bobigny, France

<sup>6</sup> Laboratoire d'Onco-Hématologie, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, 75015 Paris, France

<sup>7</sup> Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Avicenne, Service d'Anatomie Pathologique, 93000 Bobigny, France

<sup>8</sup> Fédération d'Urologie de Seine-Saint-Denis, 93100 Montreuil, France

<sup>9</sup> Université de Franche-Comté, 25000 Besançon, France

<sup>10</sup> Université de Paris, INSERM, U1137, F-75006 Paris, France

<sup>11</sup> Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Avicenne, Service d'Oncologie Médicale, 93000 Bobigny, France



## To the Editor,

The incidence and deaths of kidney cancer worldwide, and thus mainly of clear-cell renal cell carcinoma (ccRCC), have doubled since three decades, particularly in the elderly population of countries with high social-demographic index [1]. Recent therapeutic advances have considerably improved the prognosis of metastatic ccRCCs. However, almost all patients develop resistance to these treatments [2]. Metastases may derive from minority clones in the heterogeneous primary tumor [3], and there are still limited genomic data obtained from metastases [4, 5].

Using OncoScan® technology [6], we aimed to characterize metastatic ccRCCs by way of whole-genome analyses of metastatic formalin-fixed samples.

Four patients were included in the first analysis (Additional file 1: Table S1). We identified copy number alterations and loss of heterozygosity (LOH) (Additional file 1: Fig. S1A). We compared this data obtained from the recent meta-analysis we performed on ccRCCs (Additional file 1: Fig. S1B) [4] and found some abnormalities not previously described like 9q11.2 amplification (Additional file 1: Table S2). We also identified potential mutations (File ExcelS1). Using a threshold of 9 for probability score, we retrieved 48 mutations (Additional file 1: Table S3), several of them not yet described in ccRCC. We focused on the pL1575P\_c4724T\_C NOTCH1 mutation, located on chromosome 9q34.3, because it was present in 3 of the 4 metastases, and because the NOTCH pathway is a potential therapeutic target in ccRCC [7]. In addition, the 9q arm is lost in 75% of RCCs (Additional file 1: Fig. S1B) [4], and we found an allelic imbalance 9q34.3 cytoband for Patients 1 and 2 (Additional file 1: File ExcelS1).

Using digital-droplet PCR (ddPCR) and specific probes for the pL1575P\_c4724T\_C NOTCH1 mutation, we confirmed that it was present in the lymphoblastic acute leukemia T (LAL-T) positive control sample and in the 3 metastatic samples from Patients 1, 2 and 4 with high allele frequencies (Fig. 1A), but not in Patient 3. When we

tested 9 additional ccRCC metastatic samples, we identified pL1575P NOTCH1 mutations in all samples, with a mean mutant allele frequency of 53.5% (Fig. 1B).

Most NOTCH1 mutations occur in the HD and/or PEST domains (Additional file 1: Fig. S2A). The pL1575P NOTCH1 mutation is located in the HD-N domain and is responsible for NOTCH1 constitutive activation in LAL-T [8], through the release of the active NOTCH1 intracellular domain (NOTCH1-ICD) into the cytoplasm and its nucleus translocation (Additional file 1: Fig. S2B).

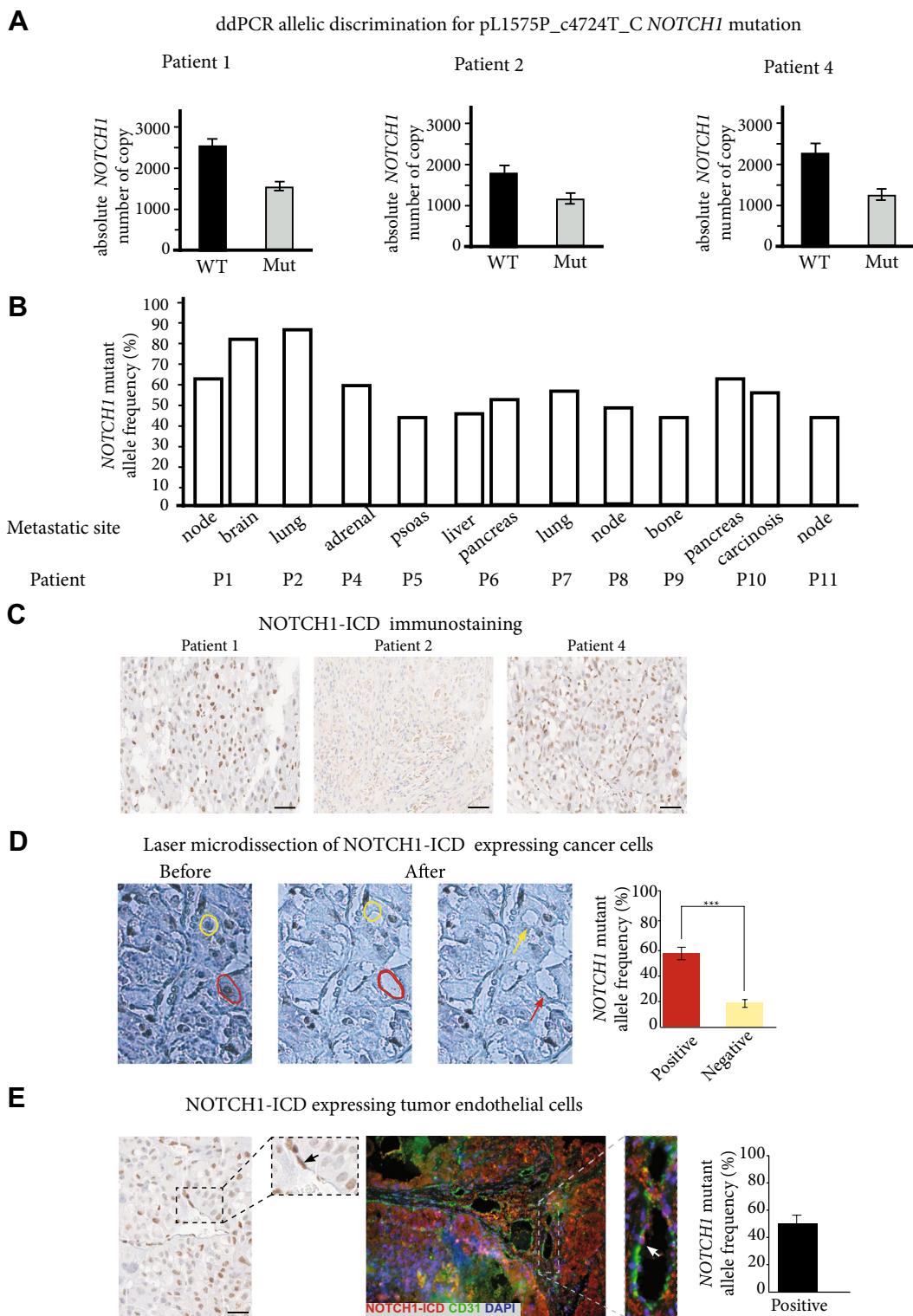
To identify NOTCH1-ICD, we performed immunostaining using an anti-NOTCH1 antibody (aa1755-1767-intracellular) which specifically recognizes an ICD epitope. We found predominant nuclear staining in the 3 metastatic samples from Patients 1, 2 and 4 (Fig. 1C), but not all cancer cells were stained. Using laser-microdissection, the pL1575P NOTCH1 mutation was mainly present in cancer cells expressing NOTCH1-ICD (57% vs. 17%,  $P < 0.01$ , Fig. 1D).

Surprisingly, we found that some CD31-expressing endothelial cells, but not all, co-expressed NOTCH1-ICD (Fig. 1E). Using laser-micro-dissection, we also identified the NOTCH1 mutation with an allelic frequency of 48% (Fig. 1E), suggesting vascular mimicry [9].

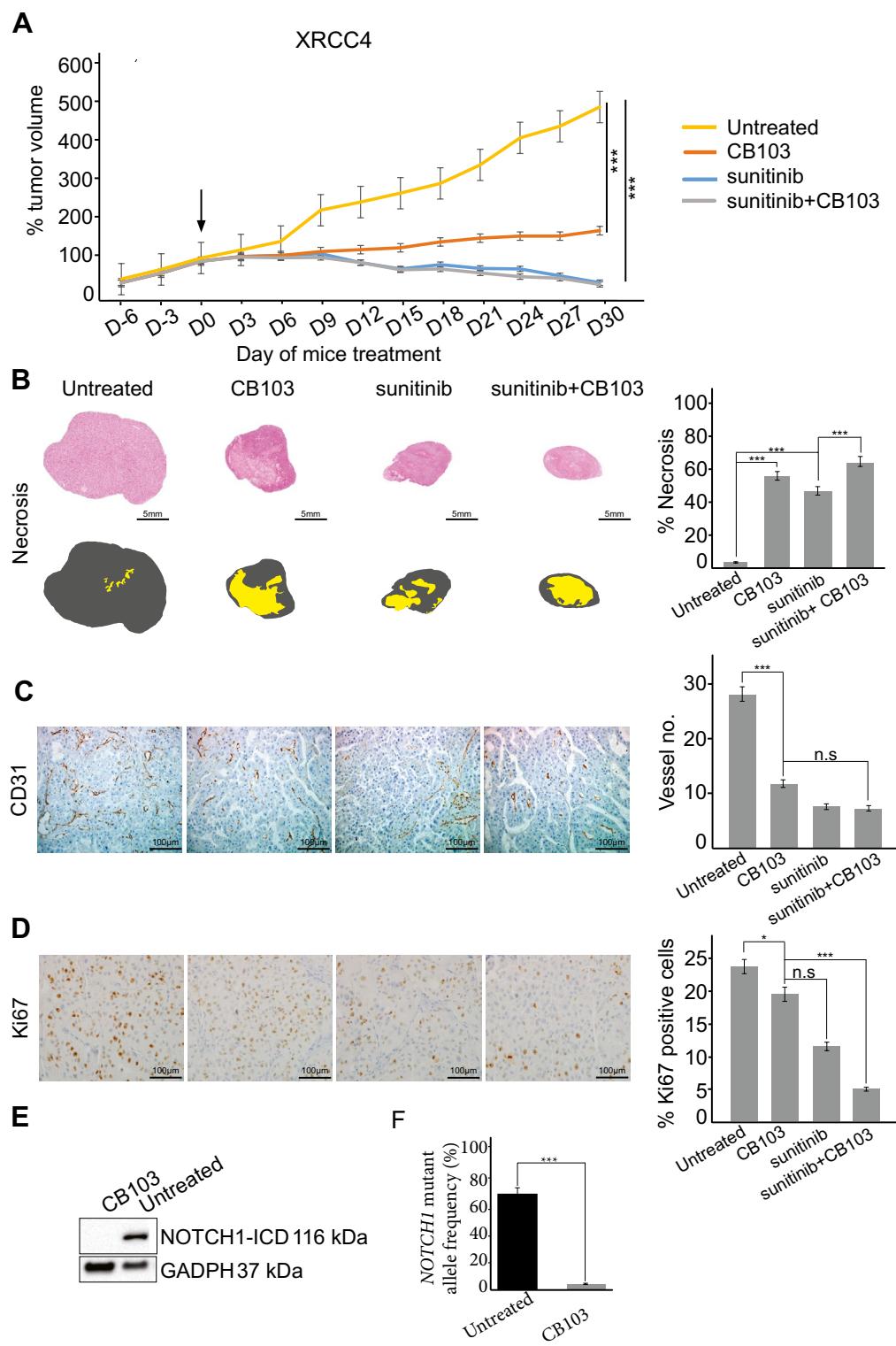
Five patient-derived xenograft models obtained from ccRCC metastases were developed in our research unit (XRCC1 to XRCC5). We identified the NOTCH1 mutation in all five models at Passage 1 (P1). Except for the XRCC5 model, the allelic frequency significantly increased between P1 and P5 (Additional file 1: Fig. S3). We chose XRCC4 and XRCC5 because of the marked enrichment for NOTCH1 mutation in the XRCC4 xenograft (48% allelic mutation frequency at P5) and a much lower allele mutation frequency for the XRCC5 xenograft (19% at P5). XRCC4 and XRCC5 were obtained from patients responding to sunitinib (Additional file 1: Fig. S4), predicting response to sunitinib in the two models [10]. We treated them with two NOTCH1 inhibitors: LY411575, a  $\gamma$ -secretase inhibitor with an IC<sub>50</sub> of 0.39 nM, and CB-103, a NOTCH1-ICD specific inhibitor (Additional file 1: Table S4 and Additional file 1: Fig. S2B). Using LY411575 administered daily by gavage, we did not observe any anti-tumor effect. In contrast, CB-103 mono-therapy induced a significant anti-tumor effect for

(See figure on next page.)

**Fig. 1** ddPCR allelic discrimination for the pL1575P\_c4724T\_C NOTCH1 mutation, in 3 of the 4 metastatic samples processed via Oncoscan® analysis (**A**), and in ten additional metastatic samples (**B**). NOTCH1-ICD-expressing cancer cells and tumor endothelial cells in human samples, NOTCH1-ICD staining is mainly nuclear in the 3 metastatic samples from Patients 1, 2 and 4 (**C**). **D** Panel B illustrates the laser-microdissection of a cancer cell expressing NOTCH1-ICD (red circle and arrow) and of a cancer cell not expressing NOTCH1-ICD (yellow circle and arrow), with a significant difference in terms of percentage of NOTCH1 mutant allele frequency. \*\*\*  $P < 0.001$ . **E** The left panel shows the NOTCH1-ICD staining of a tumor endothelial cell (black arrow). Some tumor endothelial cells can be seen to co-express NOTCH1-ICD (red) and anti-CD31 (green) on immunofluorescence staining (middle panel). The right panel shows that laser-microdissected tumor endothelial cells expressing NOTCH1-ICD harbor the pL1575P NOTCH1 mutation with an allelic frequency of 48%



**Fig. 1** (See legend on previous page.)



**Fig. 2** In vivo anti-tumor effect of CB-103 in a XRCC4 xenograft model. **A** CB-103 monotherapy, sunitinib monotherapy, or the combination of CB-103 and sunitinib significantly inhibit tumor growth after 30 days of treatment ( $n=6$  per treatment group). This is associated with a significant gradual increase in the percentage of necrotic areas **(B)**, a significant decrease in microvessel density **(C)** and in cell proliferation **(D)**. After 30 days of CB-103 monotherapy treatment, the pL1575P\_c4724T\_C NOTCH1 mutation and NOTCH1-ICD protein expression disappear on Western blot **(E)**. (\* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$ ) **(F)** NOTCH1 mutant allele frequency on laser-micro dissected cancer cells after treatment with CB103 or not, using ddPCR

both models, more marked with XRCC4 (Fig. 2A, Additional file 1: Table S5, Fig. S5A). Unexpectedly, like with sunitinib, there was also a strong induction of necrosis with CB-103 mono-therapy. The additive effect of the combined treatment was low in terms of tumor growth inhibition (Fig. 2B and Additional file 1: Fig. S5B), but tissue effects were much more marked than with sunitinib or CB-103 mono-therapy, in particular for necrotic area extent with very low cell viability. There was also a significant gradual decrease in micro-vessel density and proliferation ( $P < 0.01$ , Fig. 2C–D). CB-103 tumor growth inhibition was stronger with XRCC4 than with XRCC5 (Additional file 1: Table S5), coherent with a higher allelic mutation frequency in XRCC4. Finally, when we assessed NOTCH1-ICD expression and *NOTCH1* allelic mutation frequency in tumors after treatment, we found a significant decrease for both markers. Model XRCC4 treated with CB-103 monotherapy, *NOTCH1* allelic frequency decreased from 64 to 1%, and NOTCH1-ICD was no longer seen to be expressed on western blot (Fig. 2E, F).

Using two different methods, we showed that the pL1575P\_c4724T\_C *NOTCH1* activating mutation is frequent in metastatic ccRCCs, and this may be explained by a high sensitivity of Oncoscan® technology using formalin-fixed samples [6, 11]. Like in LAL-T, we also evidenced the benefit of using CB-103 designed to block active forms of NOTCH1-ICD [12]. CB-103 is currently being evaluated in phase II clinical trials for various malignancies, with acceptable toxicity profile [13]. Since NOTCH signalling is closely linked to immune system regulation, further studies are required to determine if this *NOTCH1* mutation is associated with response to immune checkpoint inhibitors, which would be of high translational relevance [14]. Our study opens the way to further development in metastatic ccRCC.

#### Abbreviations

ccRCC	Clear-cell renal cell carcinoma
LAL-T	Lymphoblastic acute leukemia T
XRCC	Xenograft renal cell carcinoma
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded

#### Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s40164-023-00408-z>.

**Additional file 1: Fig S1.** Copy number gains and losses in 4 metastatic RCC samples using Oncoscan® (A) compared with 433 metastatic RCC samples from our meta-analysis on genomic data of clear-cell RCC (B). Some of the abnormalities were not previously described, including 9q11.2 and 15q11.1–11.2 amplifications (red arrows on panel A). **Fig S2.** NOTCH1 protein structure and signaling pathway. (A) NOTCH1 protein structure, the mature NOTCH1 receptor is a heterodimer composed of an extracellular subunit (NOTCH1-EC) and a transmembrane and intracellular subunit (NOTCH1-TMIC). NOTCH1-EC includes epidermal growth factor (EGF)-like repeats, involved in ligand binding, three LIN-12/NOTCH repeats

(LNR), which prevent receptor activation in the absence of ligands, and the heterodimerization domain (HD) involved in non-covalent interactions between NOTCH1-EC and NOTCH1-TMIC. NOTCH1-TMIC comprises the transmembrane domain (TM) and the intracellular domain (ICD) (NOTCH1-ICD). NOTCH1-ICD comprises an RBPJ-associated molecule (RAM) domain, seven ankyrin (ANK) repeats, nuclear localization signals (NLS), a transactivation domain (TAD), and a PEST domain, in turn involved in proteasomal degradation of active NOTCH1-ICD. Most NOTCH1 mutations are located in the HD and PEST domains (red arrows), and the pL1575P\_c4724T\_C NOTCH1 mutation (highlighted in yellow) is located in the HDN domain. (B) Newly synthesized NOTCH1 precursor is cleaved by a furin-like convertase (Furin) in the Golgi apparatus to generate the mature receptor. NOTCH1 signaling occurs when a JAGGED or DELTA ligand expressed on a signal-sending cell interacts with NOTCH1 on a signal-receiving cell. This interaction triggers two sequential cleavages of NOTCH1: the first, by way of an a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) metalloproteinase, generates the substrate for the second cleavage by  $\gamma$ -secretase, which releases the active NOTCH1-ICD. NOTCH1-ICD translocates to the nucleus where it forms a transcriptional activation complex by interacting with the transcription factor CSL/RBP-Jk, mastermind-like proteins, and other coactivators (CoA), leading to the expression of NOTCH1 target genes. In physiological conditions, NOTCH1 expression is controlled by ubiquitination and proteasomal degradation of NOTCH1-ICD. **Fig S3.** ddPCR allelic discrimination for the pL1575P\_c4724T\_C NOTCH1 mutation in 5 XRCC tumor xenografts at the first (in gray) and the fifth (in black) passages. **Fig S4.** Response to sunitinib treatment in first-line setting for two patients who provided metastatic samples for xenograft in murine models. (A) Patient corresponding to the XRCC4 model. (B) Patient corresponding to the XRCC5 model. **Fig S5.** In vivo anti-tumor effect of CB-103 in the XRCC5 xenograft model. (A) CB-103 monotherapy, sunitinib monotherapy, or the combination of CB-103 and sunitinib significantly inhibit tumor growth after 30 days of treatment ( $n = 6$  per treatment group). This is associated with a significant gradual increase in the percentage of necrotic areas (B), and significant decrease in microvessel density (C). For cell proliferation, the decrease is only significant with the combination of CB-103 and sunitinib compared to untreated mice (C). After 30 days of treatment with CB-103 monotherapy, the pL1575P\_c4724T\_C NOTCH1 mutation (D) has virtually disappeared. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ ). **Fig S6.** Oncoscan® technology and the Molecular Inversion Probe: Target Generation and Hybridization Procedures. a) Annealing: Probe and gDNA hybridization; b) Gap filling with A/T or G/C nucleotides; c) Exonuclease selection for gap filled probes; d) Cleavage at site 1 for probe opening and inversion; e) Probe amplification and biotinylation; f) Cleavage at site 2 to release the tag sequence; f) Array hybridization followed by staining with phycoerythrin through the biotin-streptavidin interaction; g) Array scanning. Blue and gray colors indicate presence and absence of the phycoerythrin fluorescence signal respectively. **Fig S7.** Tumor growth inhibition coefficient in XRCC models. For a drug or a drug combination, the coefficient of inhibition is calculated as  $(a' - a)/a$ ,  $a$  being the slope of the curve before the start of treatment (Day 0), and  $a'$  the slope of the curve between Day 0 and Day 30 of treatment. If this growth inhibition coefficient is found to be less than 0, the tumor is considered sensitive to the drug administered; if it is above 0, the tumor is considered resistant to the drug. **Table S1.** Characteristics of the four patients included in the initial study using Oncoscan® technology. **Table S2.** List of genes located in locus 9p11.2, 15q11.1, and 15q11.2. **Table S3.** Point mutation identified on RCC metastases before treatment. **Table S4.** NOTCH1 targeted therapeutics. **Table S5.** Growth inhibition coefficient for drugs tested in XRCC model. **Table S6.** Characteristics of the five patient-derived xenograft models.

#### Acknowledgements

We would like to thank Angela Swaine and Sarah Leyshon for the revision of the English language.

#### Author contributions

Conception and design: AJ, GB. Development of the methodology: TOB, MEB, GB. Data acquisition (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): TOB, EA, GG, TDV, JP, MS, PV, MZ, EVG, MEB, THL, AJ, GB. Data analysis and interpretation (e.g. statistical analysis, biostatistics,

computational analysis): TOB, MEB, CL, JPF, AJ, GB. Writing, review: TOB, GB. Revision of the manuscript: all authors. Administrative, technical, or material support (i.e. reporting or organizing data, constructing databases): CL, AJ, GB. Study supervision: GB. All authors read and approved the final manuscript.

### Funding

Bourse d'Excellence de l'Ambassade de France au Viet Nam (Grant Number: 971522C).

### Availability of data and materials

The gene expression data generated during the study are part of the supplementary information. All other datasets generated during the study will be made available upon reasonable request to the corresponding author, Prof. Guilhem Bousquet, email address: guilhem.bousquet@aphp.fr.

### Declarations

#### Ethics approval and consent to participate

Five patient-derived clear-cell RCC xenograft models obtained from biopsies of metastases were implemented in our research unit. The National Ethics Committee for experimental animal studies approved this study (APA FIS#17190-2018101814245111). The ethical guidelines that were followed met the standards required by the US guideline. Animals were maintained in pathogen-free housing at Sorbonne Paris Nord University (agreement number: C9300801).

#### Consent for publication

All subjects have written informed consent.

#### Competing interests

The authors declare no competing interest.

Received: 21 December 2022 Accepted: 26 April 2023

Published online: 15 May 2023

### References

- Bai X, Yi M, Dong B, Zheng X, Wu K. The global, regional, and national burden of kidney cancer and attributable risk factor analysis from 1990 to 2017. *Exp Hematol Oncol.* 2020;9:27.
- Rini BI, Plimack ER, Stus V, Gafanov R, Hawkins R, Nosov D, et al. Pembrolizumab plus axitinib versus sunitinib for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2019;380:1116–27.
- Gerlinger M, Horswell S, Larkin J, Rowan AJ, Salm MP, Varela I, et al. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat Genet.* 2014;46:225–33.
- Bui TO, Dao VT, Nguyen VT, Feugeas J-P, Pamoukdjian F, Bousquet G. Genomics of clear-cell renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Eur Urol.* 2022. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2021.12.010>.
- Turajlic S, Xu H, Litchfield K, Rowan A, Chambers T, Lopez JL, et al. Tracking cancer evolution reveals constrained routes to metastases: TRACERx renal. *Cancer Cell.* 2018;173:581–594.e12.
- Wood HM, Foster JM, Taylor M, Tinkler-Hundal E, Tognoni FS, Wojtowicz P, et al. Comparing mutation calls in fixed tumour samples between the affymetrix OncoScan® array and PCR based next-generation sequencing. *BMC Med Genomics.* 2017;10:17.
- Bhagat TD, Zou Y, Huang S, Park J, Palmer MB, Hu C, et al. Notch pathway is activated via genetic and epigenetic alterations and is a therapeutic target in clear cell renal cancer. *J Biol Chem.* 2017;292:837–46.
- Malecki MJ, Sanchez-Irizarry C, Mitchell JL, Histen G, Xu ML, Aster JC, et al. Leukemia-associated mutations within the NOTCH1 heterodimerization domain fall into at least two distinct mechanistic classes. *Mol Cell Biol.* 2006;26:4642–51.
- Serova M, Tijeras-Raballand A, Dos Santos C, Martinet M, Neuzillet C, Lopez A, et al. Everolimus affects vasculogenic mimicry in renal carcinoma resistant to sunitinib. *Oncotarget.* 2016;7:38467–86.
- Varna M, Gapihan G, Feugeas J-P, Ratajczak P, Tan S, Ferreira I, et al. Stem cells increase in numbers in perinecrotic areas in human renal cancer. *Clin Cancer Res.* 2015;21:916–24.
- Alexiev BA, Zou YS. Clear cell papillary renal cell carcinoma: a chromosomal microarray analysis of two cases using a novel Molecular Inversion Probe (MIP) technology. *Pathol Res Pract.* 2014;210:1049–53.
- Lehal R, Zarir J, Vigolo M, Urech C, Frismantais V, Zanger N, et al. Pharmacological disruption of the Notch transcription factor complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020;117:16292–301.
- Jose e P-G, Javier C, Anastasios s S, Rogier M, Elena L-M, Analía A, et al. First-in-human phase 1–2A study of CB-103, an oral Protein-Protein Interaction Inhibitor targeting pan-NOTCH signalling in advanced solid tumors and blood malignancies. ASCO annual meeting 2018. 2018. [https://www.cellesia.com/wp-content/uploads/2021/05/7.1-ASCO-Poster\\_2018\\_Celestia.pdf](https://www.cellesia.com/wp-content/uploads/2021/05/7.1-ASCO-Poster_2018_Celestia.pdf)
- Zhou B, Lin W, Long Y, Yang Y, Zhang H, Wu K, et al. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Sig Transduct Target Ther.* 2022;7:95.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](http://biomedcentral.com/submissions)



## **Supplementary Methods**

### **Patient metastatic samples processed for OncoScan® analysis**

Four patients were included in the first analysis. They all had a metastatic clear-cell renal cell carcinoma (ccRCC) with a biopsy of a metastatic site performed before any medical treatment. All four metastatic samples processed for genomic analyses were formalin-fixed paraffin-embedded biopsy samples.

In compliance with the French bioethics legislation (2004-800; June 8, 2004), all patients had been informed of the research use of part of their samples remaining after diagnosis, and none opposed it. Informed consent was obtained from each patient to perform whole genome analyses on their tumor sample. The Clinical Research Board Ethics Committee approved this study (CPP-Ile-de-France#13218).

### **DNA purification and whole-genome analysis on human samples**

Whole genome analysis was performed on laser-micro-dissected tumor cells from the four metastatic samples using OncoScan-Express® (Affymetrix, USA). OncoScan-Express® uses a molecular inversion probe (MIP)-based genotyping system dedicated to formalin-fixed paraffin-embedded tissues, which determines the genotype of 330,000 SNPs, copy number alterations, loss of heterozygosity (LOH) and somatic mutations (Supplementary Fig. 6). MIP probes are circularizable oligonucleotides, the two ends of which carry two sequences complementary to two sequences on the genome, separated by one nucleotide (where the variant to be genotyped is located). After hybridization of the genomic DNA, the product of the reaction is divided between two tubes, and two nucleotides are added to each tube (A/T and C/G). In the tube including the nucleotide complementary to the allele on the genome, the MIP probe is ligated and becomes circular. This structure is selected using exonucleases, and linearized. The products are amplified and hybridized onto an Affymetrix microarray for

product identification. At the time we performed the analysis, OncoScan® Assay searched for 541 somatic mutations specific to cancer, with a coverage of over 200 tumor suppressors and oncogenes, and a median spacing of 1 probe per 0.5 kb for the top 10 “actionable” tumor suppressor genes, a median spacing of 1 probe per 2 kb for the top 190-plus actionable oncogenes, and a median backbone spacing of 1 probe per 9 kb.

Data analyses were performed on Nexus-7 software (BioDiscovery, USA).

### **ddPCR and validation of the *NOTCH1* mutation in metastatic samples**

A Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR) was performed using the QX100 ddPCR workflow system (Biorad, Hercules, CA, USA). The mix contained 20 ng of genomic DNA, 10 µL of ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) (Bio Rad), 1µL of *NOTCH1* probes either wild-type or specific to the pL1575P *NOTCH1* mutation (12772, Qiagen, Germany) (Supplementary Word 1) and 1 µL *RNaseP* probe (Taqman® copy number Reference Assay, 4403326, Life Technologies) per well, and the final volume for the reaction was 20 µL. Droplets were generated by a QX200 Droplet Generator (Biorad). PCR was carried out on the CFX96 Real Time System (Bio Rad). It consisted in an initial denaturing step at 95 °C for 10 min., followed by 40 denaturing cycles (94 °C for 30 s), and annealing (60°C for 1 min.). A post-amplification melting curve program was initiated by heating to 98 °C for 10 min. and then cooling to 12 °C. Each PCR run included a no-template control. The results for ddPCR were generated using QX100 Droplet Reader (Biorad) and analysed using QuantaSoft software (Biorad). The ratio of *NOTCH1*-positive droplets to *RnaseP*-positive droplets was calculated.

We calculated the mutant allele frequency using the mathematical formula Mmu/MDNAconc, as previously reported, Mmu being the number of mutant copies per droplet and MDNAconc being the DNA concentration in the reaction. Mmu and MDNAconc are calculated as follows:

$Mmu = -\ln(1-(nmu/n))$ , where nmu = number of droplets positive for mutant *NOTCH1* probe and n = total number of droplets.  $MDNAconc = -\ln(1-(nDNAcon/n))$ , where nDNAconc = number of droplets positive for wild-type *NOTCH1* probe and/or mutant *NOTCH1* probe and n = total number of droplets [1].

A DNA obtained from a patient with lymphoblastic acute leukaemia T and the presence of pL1575P *NOTCH1* mutation was provided by P.V and used as the positive control.

### **Detection of NOTCH1-ICD-expressing cancer cells in metastases and tumor xenografts**

#### ***Immunohistochemistry staining***

An indirect immunoperoxidase method was performed on 5 $\mu$ m-thick tissue sections using anti-NOTCH1-ICD (ab8925, 1:200, Abcam) as primary antibody.

The systematic controls used were the absence of primary antibody and the use of an irrelevant primary antibody of the same isotype.

#### ***Immunofluorescence staining***

To detect NOTCH1-ICD in the endothelial cells, a double indirect immunofluorescence method was performed using NOTCH1-ICD and CD31 as primary antibodies. Staining was performed with Tyramide detection kit 488CF (biotium, 99824), and 543CF (biotium, 99825) respectively, and a fluorescent mounting medium with DAPI was used for nucleus detection (E19-18, GBI labs).

#### ***Western-blot analysis***

Protein extraction was performed from cryopreserved tissue with RIPA buffer (Thermo) supplemented with 1 EDTA-free protease inhibitor cocktail tablet (Roche Diagnostics) and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich).

Western blot was performed on 10% Mini-PROTEAN TGX precast gels (Biorad), then transferred onto a 0.2  $\mu$ m Nitrocellulose membrane (Biorad) using the Trans-Blot Turbo Transfer System. Immunostaining was performed using anti-NOTCH1-ICD (ab8925, 1:500,

Abcam) and anti-GAPDH (ab9485, 1:2500, Abcam) as primary antibodies. An anti-rabbit HRP (ab32568, 1:1000, Abcam) was used as a second antibody. Western blot revelation was performed using Clarity Western ECL Substrate (Biorad) and detected on ChemiDoc XRS+ detection system (Biorad). Analyses were performed with Image Lab Software 6.1 (Biorad).

#### **Laser micro-dissection of NOTCH1-ICD expressing cells**

To confirm that NOCTH1-ICD expression in cancer cells or tumor endothelial cells was associated with *NOTCH1* mutation, we combined laser micro-dissection of NOTCH1-ICD expressing cells with ddPCR for *NOTCH1* mutation.

For each sample analysed, 7 µm-thick tissue sections were laser-micro-dissected to select a minimum of 300 cancer cells or 100 tumor endothelial cells expressing NOCTH1-ICD, using a PALM-Microbeam/Zeiss-system (Carl Zeiss, Germany). Total DNA was extracted from the micro-dissected cells using DNeasy-Micro-Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), and concentrated in a final volume of 10 µL.

For *NOTCH1* gene copy number analyses, total DNA extracted from micro-dissected tumor cells was processed using ddPCR as described above.

#### **Patient-derived clear-cell renal cell carcinoma xenografts and treatment**

Five patient-derived clear-cell RCC xenograft models obtained from biopsies of metastases were implemented in our research unit [2] (Supplementary Table 6). The National Ethics Committee for experimental animal studies approved this study (APAFIS#17190-2018101814245111). The ethical guidelines that were followed met the standards required by the US guidelines [3]. Animals were maintained in pathogen-free housing at Sorbonne Paris Nord University (agreement number: C9300801).

After successful engraftment, tumor growth was measured in two perpendicular diameters with a caliper. Tumor volumes were calculated as follows:  $V = L \times l_2 \div 2$ , L being the larger diameter (length), l the smaller (width). When tumors reached a volume of 400 mm<sup>3</sup> (n = 6

mice per treatment group), the mice were separated into four groups: i) treatment by gavage with sunitinib at 40 mg/kg/day (group 1), ii) treatment by gavage with NOTCH1 inhibitor (CB-103, HY-135145, MedChem Express at 25 mg/kg/twice daily or (LY411575, S2714, Selleckchem) at 10 mg/kg/day (group 2); iii) combined treatment by gavage with sunitinib, at 40 mg/kg/day, and with NOTCH1 inhibitor (either CB-103 or LY411575) (group 3); iv) treatment with 100 µL of 0.9% NaCl as a control (group 4). All treatments were administered for 30 days. A daily clinical score was recorded and tumor growth was measured weekly until tumor weight reached the ethically recommended limit of under 10 % of mouse body weight (Directive 2010/63/EU of European Parliament and Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes; Official Journal of European Union L 276/33). An inhibition growth coefficient was calculated for each treatment arm (Supplementary Fig. 7), using a ratio of the slopes ( $a$  and  $a'$ ) of the straight lines before and after treatment. In all xenograft models, the coefficient of inhibition for a drug was calculated as  $(a' - a)/a$ , being the slope of the curve before the start of treatment (Day 0) - and  $a'$  the slope of the curve between Day 0 and Day 30 of treatment. For a given drug combination, if the inhibition coefficient was negative, the tumor was considered sensitive to the drug. If, in contrast, it was positive, the tumor was considered resistant to this drug.

#### ***In situ assessment of necrosis, cell proliferation, angiogenesis and apoptosis***

When present, necrosis was delineated on virtual slides created on a Nanozoomer2.0H scanner (Hamamatsu/ Japan), and quantified using DotSlide2 software. Results were expressed as the sum of necrotic areas for each section, and the mean  $\pm$  SEM. For micro-vessel density, proliferation and apoptotic counts, an indirect immunoperoxidase method was performed on 5 µm-thick tissue sections, using monoclonal mouse anti-human Ki67 antibody (M724001-2, 1:100, Agilent) as primary antibody for proliferation, polyclonal rabbit anti-human cleaved-caspase-3 antibody (Asp175, 1:200, Cell signalling Technology) as primary

antibody for apoptosis, and rabbit polyclonal anti-mouse CD31 antibody (SZ31, 1:30, Dianova) as primary antibody for micro-vessel density. For CD31 staining, the secondary antibody was a rabbit anti-rat IgG H&L (ab6703, 1:200, Abcam), for Ki67 staining, a rabbit anti-mouse IgG1 H&L (clone M1gG51-4, 1:200, Abcam) was used. The secondary antibody was coupled with an anti-rabbit OmniMap detection kit (Roche diagnostic, Meylan, France). For each tumor section analyzed, proliferation and apoptotic cell counts were performed on five different fields at x400 magnification, using a ProvisAX70 microscope (Olympus, Tokyo) with a wide-field eyepiece number 26.5 providing a field size of 0.344mm<sup>2</sup> at X400 magnification. Microscope images were captured using a ColorView-III digital camera, and analyzed using Olympus-SIS Cell F software. The percentage of positive cells in 100 cancer cells was determined, and results were expressed as means ± SEM. For micro-vessel density, CD31-positive micro-vessels were counted on ten different fields, at X400 magnification. The number of positive micro-vessels was related to the total number of micro-vessels in a given surface area studied. Results were expressed as means ± standard deviation.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using R Studio 1.3.1073 statistical software.

For analysis of the copy number variation derived from the result from Oncoscan® technology and our meta-analysis data, we used the *copynumber* package in R.

For counts of NOTCH1-expressing tumor cells, the mean ±SEM was calculated for each tumor sample (primary RCC, metastasis or tumor-xenograft), and represented in bar graphs.

Quantitative values were compared using Student's t-test (two-tailed), while proportions were compared using the Z-test. P values under 0.05 were considered significant.

## References

1. Hrebien S, O'Leary B, Beaney M, Schiavon G, Fribbens C, Bhambra A, et al. Reproducibility of Digital PCR Assays for Circulating Tumor DNA Analysis in Advanced Breast Cancer. Mazoyer S, editor. PLoS ONE. 2016;11:e0165023.
2. Bousquet G, El Bouchtaoui M, Sophie T, Leboeuf C, de Bazelaire C, Ratajczak P, et al. Targeting autophagic cancer stem-cells to reverse chemoresistance in human triple negative breast cancer. Oncotarget. 2017;8:35205–21.
3. U.S. Department of Health and Human Services National Institutes of Health Office of Laboratory Animal Welfare. Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals. NIH Publication revised; 2015.
4. Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. Survival and Prognostic Stratification of 670 Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma. JCO. 1999;17:2530–2530.

## Figure legends

**Supplementary Fig. 1.** Copy number gains and losses in 4 metastatic RCC samples using Oncoscan® (A) compared with 433 metastatic RCC samples from our meta-analysis on genomic data of clear-cell RCC (B). Some of the abnormalities were not previously described, including 9q11.2 and 15q11.1-11.2 amplifications (red arrows on panel A).

**Supplementary Fig. 2.** NOTCH1 protein structure and signaling pathway. (A) NOTCH1 protein structure, the mature NOTCH1 receptor is a heterodimer composed of an extracellular subunit (NOTCH1-EC) and a transmembrane and intracellular subunit (NOTCH1-TMIC). NOTCH1-EC includes epidermal growth factor (EGF)-like repeats, involved in ligand binding, three LIN-12/NOTCH repeats (LNR), which prevent receptor activation in the absence of ligands, and the heterodimerization domain (HD) involved in non-covalent interactions between NOTCH1-EC and NOTCH1-TMIC. NOTCH1-TMIC comprises the transmembrane domain (TM) and the intracellular domain (ICD) (NOTCH1-ICD). NOTCH1-ICD comprises an RBPJ-associated molecule (RAM) domain, seven ankyrin (ANK) repeats, nuclear localization signals (NLS), a transactivation domain (TAD), and a PEST domain, in turn involved in proteasomal degradation of active NOTCH1-ICD. Most NOTCH1 mutations are located in the HD and PEST domains (red arrows), and the pL1575P\_c4724T\_C NOTCH1 mutation (highlighted in yellow) is located in the HDN domain. (B) Newly synthesized NOTCH1 precursor is cleaved by a furin-like convertase (Furin) in the Golgi apparatus to generate the mature receptor. NOTCH1 signaling occurs when a JAGGED or DELTA ligand expressed on a signal-sending cell interacts with NOTCH1 on a signal-receiving cell. This interaction triggers two sequential cleavages of NOTCH1: the first, by way of an a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) metalloproteinase, generates the substrate for the second cleavage by  $\gamma$ -secretase, which releases the active NOTCH1-ICD. NOTCH1-ICD translocates to the nucleus where it forms a transcriptional activation complex

by interacting with the transcription factor CSL/RBP-Jk, mastermind-like proteins, and other coactivators (CoA), leading to the expression of NOTCH1 target genes. In physiological conditions, NOTCH1 expression is controlled by ubiquitination and proteasomal degradation of NOTCH1-ICD.

**Supplementary Fig. 3.** ddPCR allelic discrimination for the pL1575P\_c4724T\_C NOTCH1 mutation in 5 XRCC tumor xenografts at the first (in gray) and the fifth (in black) passages.

**Supplementary Fig. 4.** Response to sunitinib treatment in first-line setting for two patients who provided metastatic samples for xenograft in murine models. (A) Patient corresponding to the XRCC4 model. (B) Patient corresponding to the XRCC5 model.

**Supplementary Fig. 5.** In vivo anti-tumor effect of CB-103 in the XRCC5 xenograft model. (A) CB-103 monotherapy, sunitinib monotherapy, or the combination of CB-103 and sunitinib significantly inhibit tumor growth after 30 days of treatment ( $n = 6$  per treatment group). This is associated with a significant gradual increase in the percentage of necrotic areas (B), and significant decrease in microvessel density (C). For cell proliferation, the decrease is only significant with the combination of CB-103 and sunitinib compared to untreated mice (C). After 30 days of treatment with CB-103 monotherapy, the pL1575P\_c4724T\_C NOTCH1 mutation (D) has virtually disappeared. (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

**Supplementary Fig. 6.** Oncoscan® technology and the Molecular Inversion Probe: Target Generation and Hybridization Procedures. a) Annealing: Probe and gDNA hybridization; b) Gap filling with A/T or G/C nucleotides; c) Exonuclease selection for gap filled probes; d) Cleavage at site 1 for probe opening and inversion; e) Probe amplification and biotinylation; f) Cleavage at site 2 to release the tag sequence; f) Array hybridization followed by staining with phycoerythrin through the biotin-streptavidin interaction; g) Array scanning. Blue and

gray colors indicate presence and absence of the phycoerythrin fluorescence signal respectively.

**Supplementary Fig. 7.** Tumor growth inhibition coefficient in XRCC models. For a drug or a drug combination, the coefficient of inhibition is calculated as  $(a' - a)/a$ ,  $a$  being the slope of the curve before the start of treatment (Day 0), and  $a'$  the slope of the curve between Day 0 and Day 30 of treatment. If this growth inhibition coefficient is found to be less than 0, the tumor is considered sensitive to the drug administered; if it is above 0, the tumor is considered resistant to the drug.

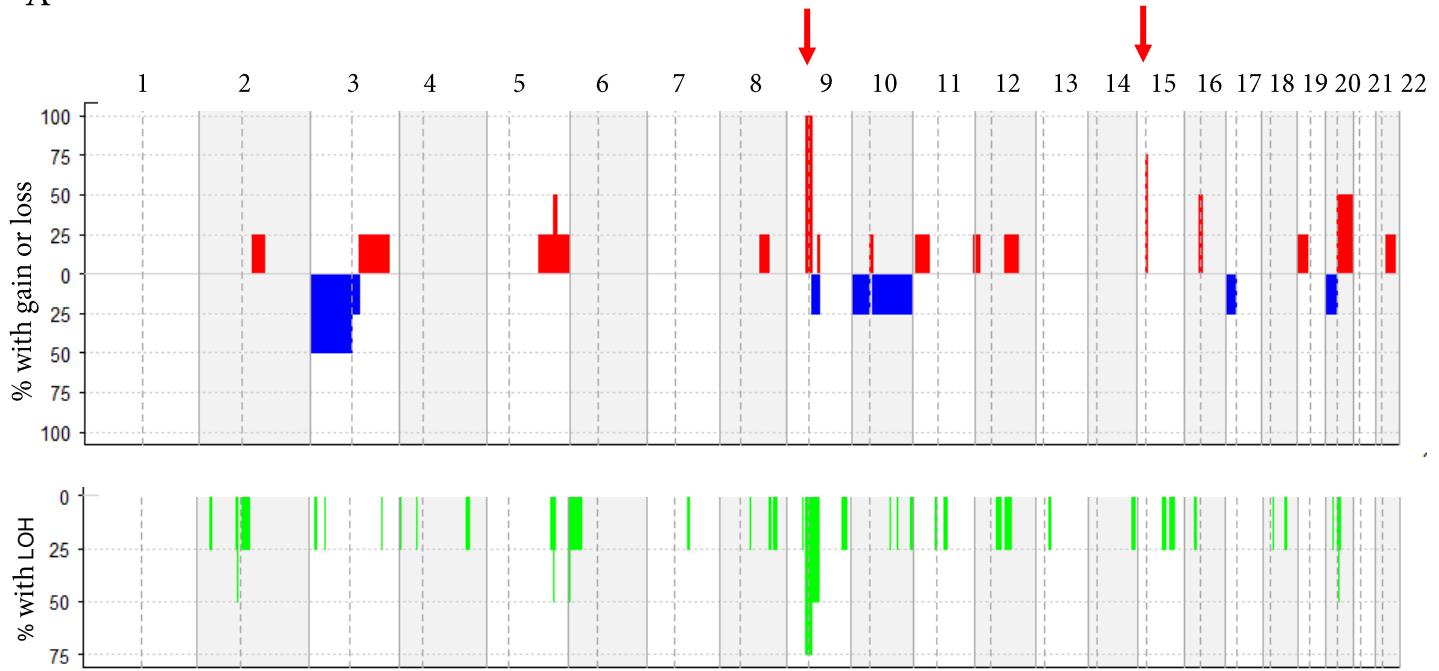
**Supplementary Table 1: Characteristics of the four patients included in the initial study using Oncoscan® technology**

	Age at the time of surgical sampling	Histological type	Furhman grade	Risk group*	Metastatic localizations	Site of surgical sampling
Patient 1	57	Clear-cell	3	Intermediate	Brain, lung, lymph nodes	Lung
Patient 2	80	Clear-cell	3	Good	Lung	Lung
Patient 3	60	Clear-cell	3	Intermediate	Lung	Lung
Patient 4	54	Clear-cell	3	Good	Adrenal, brain	Adrenal

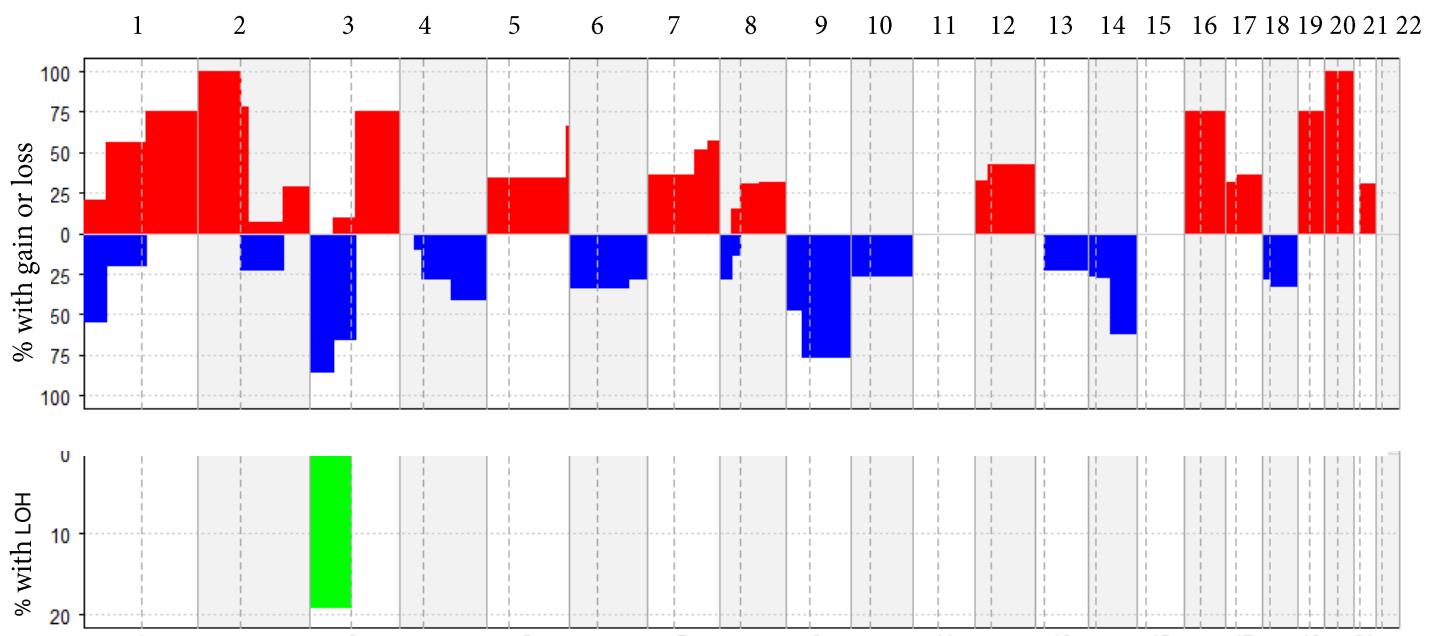
\* According to MSKCC classification [4]

## Supplementary Figure 1

A



B



**Supplementary Table 2. List of genes located in locus 9p11.2, 15q11.1, and 15q11.2**

ID	Locus	Gene	Reference	Function in renal cancer
1	9p11.2	<i>MIR1299</i>	1. Lin., <i>J Cell Biochem.</i> , 2020	MIR1299 encodes the acting circRNA and circ-EGLN3, which promotes renal cell carcinoma proliferation by regulating of IRF7 expression
2		<i>CNTNAP3B</i>		Unknown
3		<i>FOXD4L6</i>		Unknown
4		<i>CBWD6</i>		Unknown
5		<i>PGM5P2</i>		Unknown
6		<i>SPATA31A6</i>		Unknown
7		<i>ANKRD20A2P</i>		Unknown
8		<i>MEP1AP1</i>		Unknown
9		<i>PTS-P1</i>		Unknown
10		<i>FAM27E2</i>		Unknown
11		<i>FAM95B1</i>		Unknown
12		<i>GXYLT1P3</i>		Unknown
13		<i>MIR4477A</i>		Unknown
14		<i>BMS1P14</i>		Unknown
15		<i>FRG1HP</i>		Unknown
16		<i>RPL7AP45</i>		Unknown
17		<i>LOC100132004</i>		Unknown
18		<i>LINC00268</i>		Unknown
19		<i>RNA5SP530</i>		Unknown
20		<i>RN7SL565P</i>		Unknown
21		<i>RN7SL343P</i>		Unknown
22		<i>IGKV1OR9-2</i>		Unknown
23		<i>RNU6-1269P</i>		Unknown
24		<i>RNU6-156P</i>		Unknown
25		<i>FAM242F</i>		Unknown
26		<i>AQP7P5</i>		Unknown
27		<i>LOC102724580</i>		Unknown
28		<i>CDRT15P14</i>		Unknown
29		<i>CDRT15P6</i>		Unknown
30		<i>SNX18P8</i>		Unknown
31		<i>CDK2AP2P1</i>		Unknown
32		<i>RBM17P3</i>		Unknown
33		<i>VN2R6P</i>		Unknown
34		<i>FAM27D1</i>		Unknown
35		<i>CNN2P2</i>		Unknown
36		<i>MYO5BP1</i>		Unknown
37		<i>PTGER4P1</i>		Unknown
38		<i>LOC440896</i>		Unknown
39		<i>LOC107984035</i>		Unknown
40		<i>LOC112268035</i>		Unknown
41		<i>LOC112268034</i>		Unknown
42		<i>LOC112268033</i>		Unknown

43		<i>LOC107987000</i>	Unknown
44		<i>LOC107986999</i>	Unknown
45		<i>LOC107986998</i>	Unknown
46		<i>LOC107986997</i>	Unknown
47		<i>LOC107986995</i>	Unknown
48		<i>LOC107986993</i>	Unknown
49		<i>LOC107986992</i>	Unknown
50		<i>LOC107986991</i>	Unknown
51		<i>LOC107984006</i>	Unknown
52		<i>LOC105376065</i>	Unknown
53		<i>LOC105376063</i>	Unknown
54		<i>LOC105376060</i>	Unknown
55		<i>LOC105376058</i>	Unknown
56		<i>LOC105376057</i>	Unknown
57		<i>LOC105369249</i>	Unknown
58		<i>LOC103047893</i>	Unknown
59		<i>LOC102724431</i>	Unknown
60		<i>LOC101928906</i>	Unknown
61		<i>LOC100421691</i>	Unknown
62		<i>LOC100420440</i>	Unknown
63		<i>LOC100419924</i>	Unknown
64		<i>LOC100419690</i>	Unknown
65	15q11.1		Unknown
66		<i>CHEK2P2</i>	Unknown
67		<i>IGHV1OR15-9</i>	Unknown
68		<i>BMS1P15</i>	Unknown
69		<i>IGHV1OR15-2</i>	Unknown
70		<i>IGHV3OR15-7</i>	Unknown
71		<i>RHPN2P1</i>	Unknown
72		<i>SLC20A1P3</i>	Unknown
73		<i>RN7SL584P</i>	Unknown
74		<i>RNU6-978P</i>	Unknown
75		<i>FAM30B</i>	Unknown
76		<i>BCAR1P1</i>	Unknown
77		<i>LOC105379203</i>	Unknown
78		<i>LOC646071</i>	Unknown
79	15q11.2	<i>UBE3A</i>	UBF3A (known as E6AP) is an enzyme that is involved in protein targeting for degradation 1. Wu, Genet Mol Res., 2016
80			SNRPN is one of the RNA-binding proteins, with a role in the post-transcriptional regulation of gene expression. These RNA-binding proteins are related to known cancer biomarkers (such as BCL2, promoting ovarian cancer cell survival...). Thus, dysfunctional RNA-binding protein can lead to oncogenes in pRCC. 1. Jiang., Front Genet., 2021
81			2. Munroe, Front Immunol., 2021
82			3. Schweinfest., Cancer Res., 1997
83			4. Schuster., Lab Invest., 2003
84			5. Larsson., Cell., 1995

85		6. Richards., J Exp Med., 1998	
86		7. Kondo., Oncogene., 1995	
87	<i>SNHG14</i>	1. Liu., Am J Cancer Res., 2017	SNHG14 is a long non-coding RNA, that promotes ccRCC cell migration and invasion by acting as a competing endogenous RNA.
88		2. Wang., BMC Nephrol., 2020	
89	<i>PWRN1</i>	1. Qing., Mol Med Rep., 2019	PWRN1 is a long non-coding RNA, that promotes pRCC cell migration and invasion by acting as a competing endogenous RNA.
90	<i>DEL15Q11.2</i>		Unknown
91	<i>MKRN3</i>		Unknown
92	<i>CYFIP1</i>		Unknown
93	<i>NDN</i>		Unknown
94	<i>NIPA1</i>		Unknown
95	<i>MAGEL2</i>		Unknown
96	<i>LOC102724971</i>		Unknown
97	<i>SNURF</i>		Unknown
98	<i>NPAP1</i>		Unknown
99	<i>NIPA2</i>		Unknown
100	<i>TUBGCP5</i>		Unknown
101	<i>PWRN2</i>		Unknown
102	<i>SNORD116-1</i>		Unknown
103	<i>PWAR1</i>		Unknown
104	<i>IPW</i>		Unknown
105	<i>PWAR5</i>		Unknown
106	<i>SNORD115-1</i>		Unknown
107	<i>POTEAB</i>		Unknown
108	<i>HERC2P2</i>		Unknown
109	<i>POTEAB3</i>		Unknown
110	<i>NBEAP1</i>		Unknown
111	<i>PWARSN</i>		Unknown
112	<i>NF1P1</i>		Unknown
113	<i>SNORD116@</i>		Unknown
114	<i>GOLGA6L2</i>		Unknown
115	<i>IGHV10R15-1</i>		Unknown
116	<i>POTEAB2</i>		Unknown
117	<i>HERC2P6</i>		Unknown
118	<i>MIR4508</i>		Unknown
119	<i>NF1P2</i>		Unknown
120	<i>OR4N4</i>		Unknown
121	<i>PWAR6</i>		Unknown
122	<i>GOLGA6L22</i>		Unknown
123	<i>IGHV10R15-3</i>		Unknown
124	<i>SNORD115-48</i>		Unknown
125	<i>SNORD115-44</i>		Unknown

126		<i>SNORD115-43</i>	Unknown
127		<i>SNORD115-42</i>	Unknown
128		<i>SNORD115-41</i>	Unknown
129		<i>SNORD115-40</i>	Unknown
130		<i>SNORD115-39</i>	Unknown
131		<i>SNORD115-38</i>	Unknown
132		<i>SNORD115-37</i>	Unknown
133		<i>SNORD115-36</i>	Unknown
134		<i>SNORD115-35</i>	Unknown
135		<i>SNORD115-34</i>	Unknown
136		<i>SNORD115-33</i>	Unknown
137		<i>SNORD115-32</i>	Unknown
138		<i>SNORD115-31</i>	Unknown
139		<i>SNORD115-30</i>	Unknown
140		<i>SNORD115-29</i>	Unknown
141		<i>SNORD115-26</i>	Unknown
142		<i>SNORD115-25</i>	Unknown
143		<i>SNORD115-23</i>	Unknown
144		<i>SNORD115-22</i>	Unknown
145		<i>SNORD115-21</i>	Unknown
146		<i>SNORD115-20</i>	Unknown
147		<i>SNORD115-19</i>	Unknown
148		<i>SNORD115-18</i>	Unknown
149		<i>SNORD115-17</i>	Unknown
150		<i>SNORD115-16</i>	Unknown
151		<i>SNORD115-15</i>	Unknown
152		<i>SNORD115-14</i>	Unknown
153		<i>SNORD115-13</i>	Unknown
154		<i>SNORD115-12</i>	Unknown
155		<i>SNORD115-11</i>	Unknown
156		<i>SNORD115-10</i>	Unknown
157		<i>SNORD115-9</i>	Unknown
158		<i>SNORD115-8</i>	Unknown
159		<i>SNORD115-7</i>	Unknown
160		<i>SNORD115-6</i>	Unknown
161		<i>SNORD115-5</i>	Unknown
162		<i>SNORD115-4</i>	Unknown
163		<i>SNORD115-3</i>	Unknown
164		<i>SNORD115-2</i>	Unknown
165		<i>MIR5701-1</i>	Unknown
166		<i>GOLGA6L6</i>	Unknown
167		<i>GOLGA6L1</i>	Unknown
168		<i>IGHV10R15-5</i>	Unknown
169		<i>PWAR4</i>	Unknown
170		<i>SNORD116-18</i>	Unknown
171		<i>SNORD116-6</i>	Unknown

172		<i>SNORD116-21</i>	Unknown
173		<i>MIR1268A</i>	Unknown
174		<i>SNORD116-27</i>	Unknown
175		<i>SNORD116-26</i>	Unknown
176		<i>SNORD116-20</i>	Unknown
177		<i>SNORD116-14</i>	Unknown
178		<i>SNORD116-13</i>	Unknown
179		<i>SNORD116-7</i>	Unknown
180		<i>SNORD116-19</i>	Unknown
181		<i>GOLGA8DP</i>	Unknown
182		<i>ABCB10P1</i>	Unknown
183		<i>WHAMMP3</i>	Unknown
184		<i>GOLGA8CP</i>	Unknown
185		<i>SNORD116-29</i>	Unknown
186		<i>SNORD116-24</i>	Unknown
187		<i>SNORD116-22</i>	Unknown
188		<i>SNORD116-8</i>	Unknown
189		<i>SNORD116-5</i>	Unknown
190		<i>SNORD116-4</i>	Unknown
191		<i>IGHV4OR15-8</i>	Unknown
192		<i>SNORD116-28</i>	Unknown
193		<i>SNORD116-25</i>	Unknown
194		<i>SNORD116-23</i>	Unknown
195		<i>SNORD116-17</i>	Unknown
196		<i>SNORD116-16</i>	Unknown
197		<i>SNORD116-15</i>	Unknown
198		<i>SNORD116-12</i>	Unknown
199		<i>SNORD116-11</i>	Unknown
200		<i>SNORD116-10</i>	Unknown
201		<i>SNORD116-9</i>	Unknown
202		<i>SNORD116-3</i>	Unknown
203		<i>SNORD116-2</i>	Unknown
204		<i>GOLGA8IP</i>	Unknown
205		<i>SNORD109B</i>	Unknown
206		<i>OR4H6P</i>	Unknown
207		<i>GOLGA8S</i>	Unknown
208		<i>SNORD115-46</i>	Unknown
209		<i>SNORD116-30</i>	Unknown
210		<i>SNORD115-47</i>	Unknown
211		<i>SNORD115-45</i>	Unknown
212		<i>SNORD115-28</i>	Unknown
213		<i>SNORD115-27</i>	Unknown
214		<i>SNORD115-24</i>	Unknown
215		<i>LINC02203</i>	Unknown
216		<i>LINC01193</i>	Unknown
217		<i>HERC2P7</i>	Unknown

218		<i>SNORD64</i>	Unknown
219		<i>SNORD109A</i>	Unknown
220		<i>SNORD108</i>	Unknown
221		<i>SNORD107</i>	Unknown
222		<i>MIR5701-3</i>	Unknown
223		<i>MIR5701-2</i>	Unknown
224		<i>OR4M2</i>	Unknown
225		<i>IGHD1OR15-1A</i>	Unknown
226		<i>IGHD1OR15-1B</i>	Unknown
227		<i>IGHD2OR15-2A</i>	Unknown
228		<i>IGHD2OR15-2B</i>	Unknown
229		<i>IGHD2OR15-3A</i>	Unknown
230		<i>IGHD2OR15-3B</i>	Unknown
231		<i>IGHD2OR15-4A</i>	Unknown
232		<i>IGHD2OR15-4B</i>	Unknown
233		<i>IGHD2OR15-5A</i>	Unknown
234		<i>IGHD2OR15-5B</i>	Unknown
235		<i>BMS1P16</i>	Unknown
236		<i>MIR3118-2</i>	Unknown
237		<i>MIR3118-4</i>	Unknown
238		<i>MIR3118-3</i>	Unknown
239		<i>MIR4509-1</i>	Unknown
240		<i>IGHV1OR15-4</i>	Unknown
241		<i>IGHV1OR15-6</i>	Unknown
242		<i>OR4N3BP</i>	Unknown
243		<i>OR1Q1BP</i>	Unknown
244		<i>OR1K1BP</i>	Unknown
245		<i>OR4M2B</i>	Unknown
246		<i>OR4H6BP</i>	Unknown
247		<i>OR4N4C</i>	Unknown
248		<i>GOLGA8EP</i>	Unknown
249		<i>OR4N3P</i>	Unknown
250		<i>OR11K1P</i>	Unknown
251		<i>RPS27P2</i>	Unknown
252		<i>RPL5P1</i>	Unknown
253		<i>RPS8P10</i>	Unknown
254		<i>VN1R63P</i>	Unknown
255		<i>VN1R62P</i>	Unknown
256		<i>VN1R61P</i>	Unknown
257		<i>VN1R60P</i>	Unknown
258		<i>PWRN3</i>	Unknown
259		<i>LOC642131</i>	Unknown
260		<i>RN7SL545P</i>	Unknown
261		<i>RNU6-498P</i>	Unknown
262		<i>RN7SL536P</i>	Unknown
263		<i>RN7SL400P</i>	Unknown

264		<i>RNU6-1235P</i>	Unknown
265		<i>RNU6-749P</i>	Unknown
266		<i>RNU6-741P</i>	Unknown
267		<i>RNU6-631P</i>	Unknown
268		<i>RN7SL759P</i>	Unknown
269		<i>RN7SL495P</i>	Unknown
270		<i>RN7SL106P</i>	Unknown
271		<i>PWRN4</i>	Unknown
272		<i>LOC102724737</i>	Unknown
273		<i>LOC102723623</i>	Unknown
274		<i>LOC102723534</i>	Unknown
275		<i>NF1P9</i>	Unknown
276		<i>LOC100996379</i>	Unknown
277		<i>PDCD6IPP1</i>	Unknown
278		<i>MPHOSPH10P5</i>	Unknown
279		<i>MPHOSPH10P9</i>	Unknown
280		<i>MPHOSPH10P4</i>	Unknown
281		<i>GRAMD4P6</i>	Unknown
282		<i>GRAMD4P5</i>	Unknown
283		<i>BCAR1P2</i>	Unknown
284		<i>LONRF2P4</i>	Unknown
285		<i>LONRF2P3</i>	Unknown
286		<i>NBEAP4</i>	Unknown
287		<i>DMAC1P1</i>	Unknown
288		<i>OR11J6P</i>	Unknown

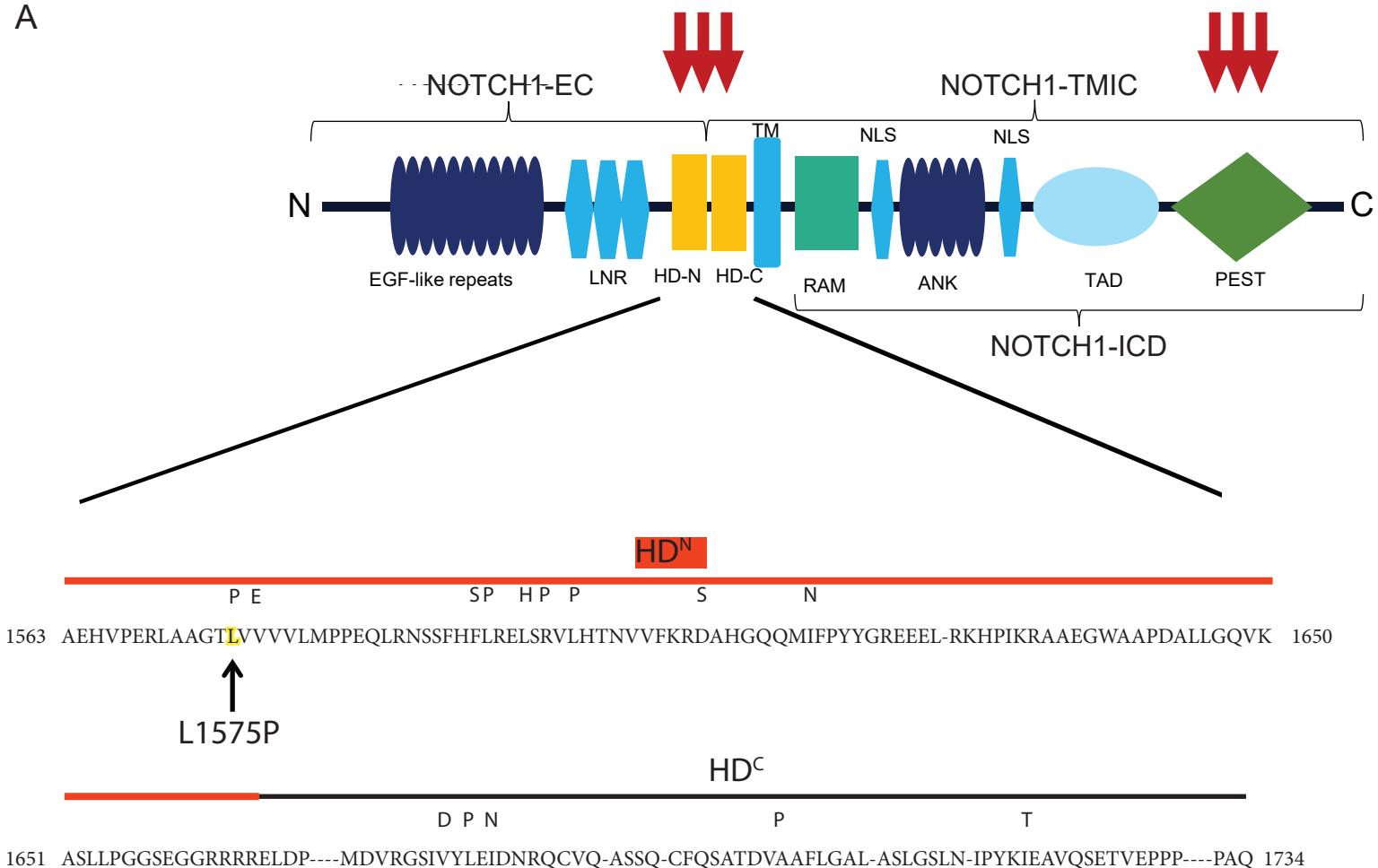
**Supplementary Table 3: Point mutation identified on RCC metastases before treatment**

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
ABL1_pF359V_c1075T_G	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>16</b>	<b>12</b>
NPM1_pW288fs12_c863_864insCATG_allele1	<b>13</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>11</b>
<b>NOTCH1_pL1575P_c4724T_C</b>	<b>11</b>	<b>21</b>	<b>0</b>	<b>9</b>
MEN1_p_c654_plus_3A_G	3	<b>20</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
VHL_pE160K_c478G_A	<b>11</b>	1	<b>9</b>	<b>10</b>
RET_pM918T_c2753T_C	<b>28</b>	0	1	1
PTEN_pI101T_c302T_C	<b>17</b>	5	<b>14</b>	<b>11</b>
PTEN_pE235X_c703G_T	<b>14</b>	<b>12</b>	6	5
PTEN_pR173C_c517C_T	<b>19</b>	-1	7	3
PIK3CA_pC420R_c1258T_C	<b>16</b>	-1	-1	-1
PIK3CA_pC901F_c2702G_T	<b>15</b>	6	4	6
PIK3CA_pH701P_c2102A_C	<b>14</b>	-1	1	-1
PIK3CA_pY1021C_c3062A_G	<b>10</b>	5	8	8
PDGFRA_pD1071N_c3211G_A	<b>11</b>	1	<b>12</b>	8
NF1_pR816X_c2446C_T	<b>19</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	5
NF1_pK1444E_c4330A_G	<b>19</b>	-1	7	5
NF1_pR1276X_c3826C_T	<b>16</b>	1	8	4
NF1_pR461X_c1381C_T	<b>12</b>	5	<b>12</b>	5
NF2_pQ362X_c1084C_T	<b>16</b>	1	<b>10</b>	4
RB1_p_c2107_minus_2A_G	<b>11</b>	-1	<b>13</b>	<b>9</b>
RB1_pQ702X_c2104C_T	<b>13</b>	6	<b>12</b>	<b>11</b>
RB1_pR787X_c2359C_T	<b>14</b>	<b>13</b>	8	-1
RB1_p_c1961_minus_1G_A	8	<b>9</b>	<b>12</b>	8
RB1_pR251X_c751C_T	7	6	<b>12</b>	0
CDKN2A_p_c151_min_1G_A	7	<b>11</b>	7	5
BRCA1_pG1077W_c3229G_T	<b>13</b>	-1	1	<b>14</b>
BRCA2_pR2678S_c8034G_T	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>11</b>	-1
BRCA2_pS1682S_c5046T_C	<b>10</b>	3	<b>13</b>	<b>11</b>
APC_pQ1367X_c4099C_T	<b>15</b>	0	<b>14</b>	<b>10</b>
APC_pR213X_c637C_T	<b>15</b>	-1	0	7
APC_pQ789X_c2365C_T	<b>13</b>	-1	3	-1
APC_pE853X_c2557G_T	4	5	<b>12</b>	4
NPM1_pW288fs12_c863_864insTCTG_allele1	<b>19</b>	4	6	4
NPM1_pW288fs12_c863_864insCCTG_allele1	<b>11</b>	4	7	6
ERBB2_pG776S_c2326G_A	<b>12</b>	6	5	<b>10</b>
TP53_pE336X_c1006G_T	<b>10</b>	<b>11</b>	8	6
TP53_pC135F_c404G_T	-1	<b>11</b>	0	-1
KRAS_pQ61K_c181C_A	<b>9</b>	<b>14</b>	0	8
NRAS_pQ61H_c183A_C	<b>12</b>	6	3	-1
PAK7_pT397K_c1190C_A	<b>19</b>	<b>12</b>	4	6
SMAD4_pD537Y_c1609G_T	<b>16</b>	<b>11</b>	6	4
RUNX1_pR166X_c496C_T	<b>15</b>	8	4	8
MLH1_pC233R_c697T_C	<b>11</b>	-1	-1	4
IRAK1_pS690G_c2068A_G	<b>14</b>	-1	-1	<b>11</b>

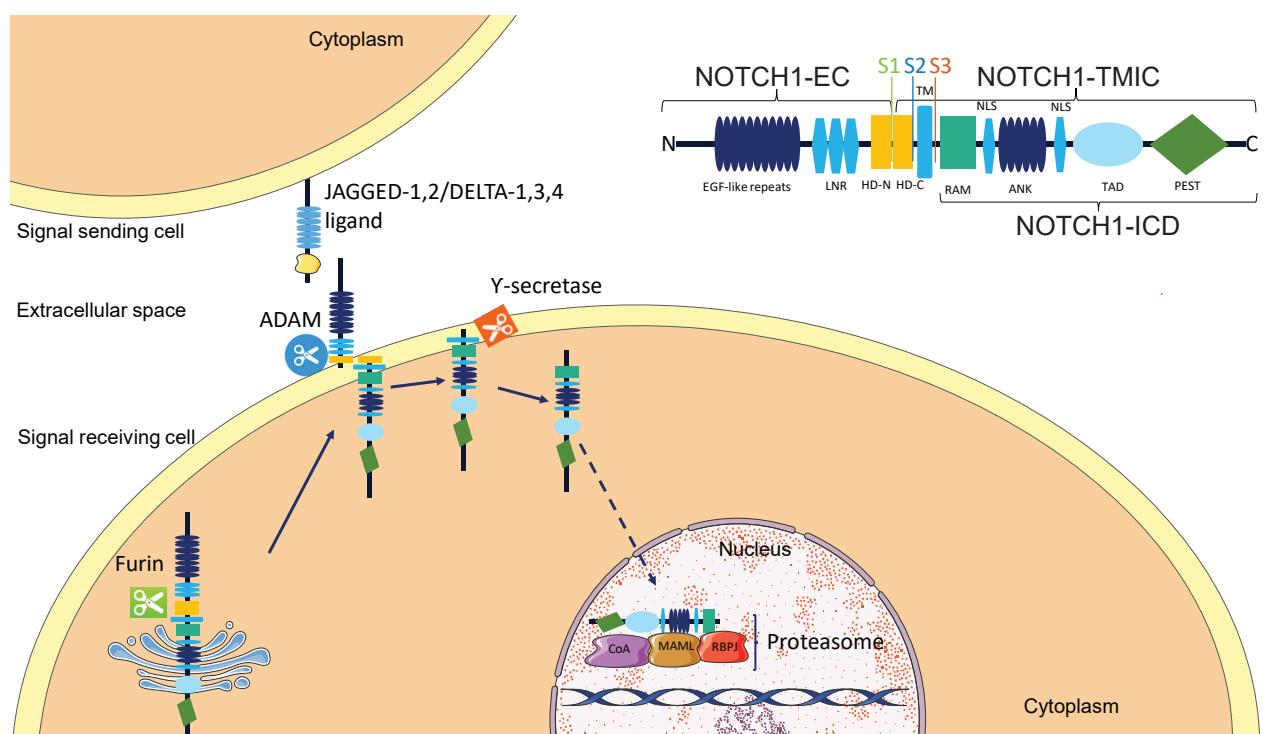
TSHR_pM453T_c1358T_C	<b>13</b>	8	6	1
CBL_pR420Q_c1259G_A	<b>11</b>	7	<b>11</b>	5
MSH2_pR711X_c2131C_T	3	<b>11</b>	<b>9</b>	-1
INPP4A_pE940D_c2820A_C	<b>11</b>	-1	2	8

## Supplementary Figure 2

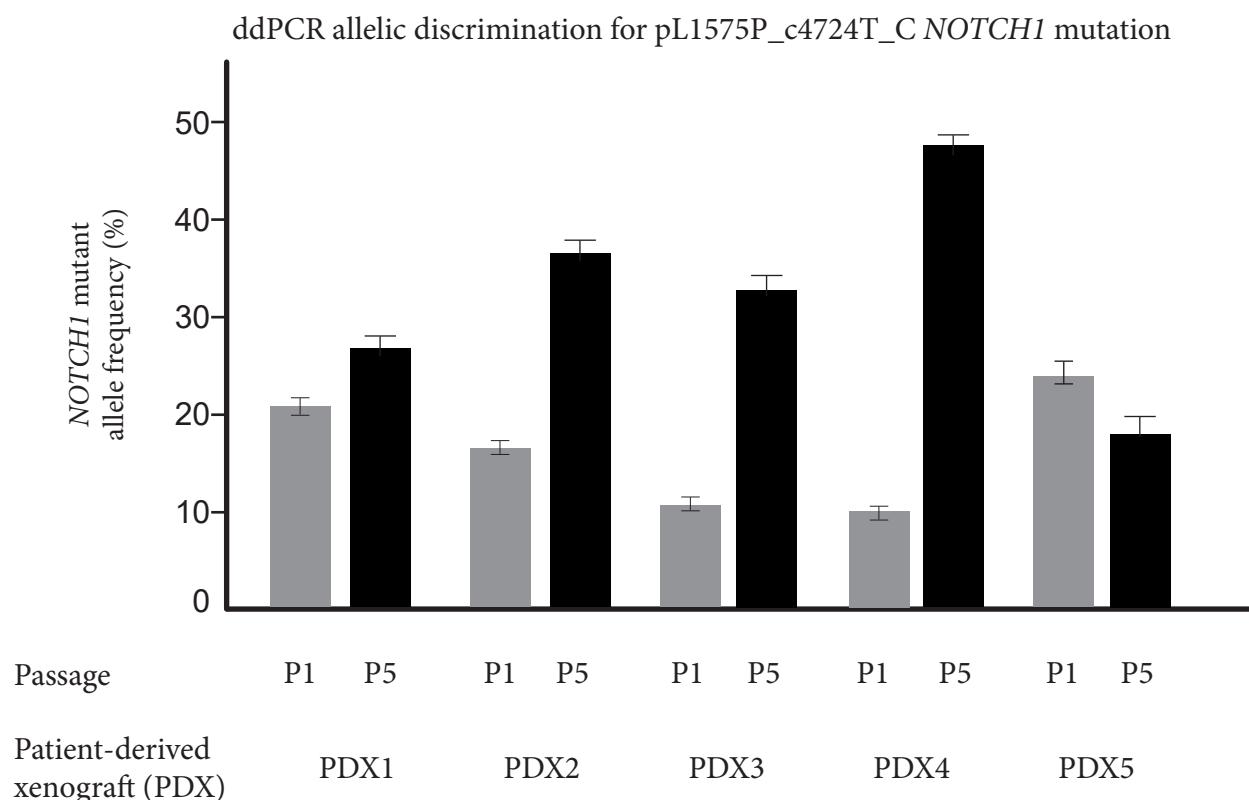
A



B



### Supplementary Figure 3



**Supplementary Table 4. NOTCH1 targeted therapeutics**

Mechanism of action	Drug name	Stage of drug development	IC50 (nM)
<b>Anti-DLL4 monoclonal antibodies</b>	Demcizumab	Phase II	
	Enoticumab (REGN421)	Phase I	
	MEdI0639	Phase I	
<b>Anti-NOTCH1 monoclonal antibodies</b>	Brontictuzumab	Phase I	
<b><math>\gamma</math>-secretase inhibitors (GSI)</b>	RO4929097 (R4733)	Phase II	5
	LY3039478 (JSMD194)	Phase I	0.41
	Nirogacestat (PF-03084014)	Phase III	13.3
	AL101 (BMS-906024)	Phase II	1.6
	LY411575	Preclinical study	0.39
<b>NOTCH1 transcription complex inhibitors</b>	CB-103	Phase II	

**Supplementary Table 5: Growth inhibition coefficient for drugs tested in XRCC model**

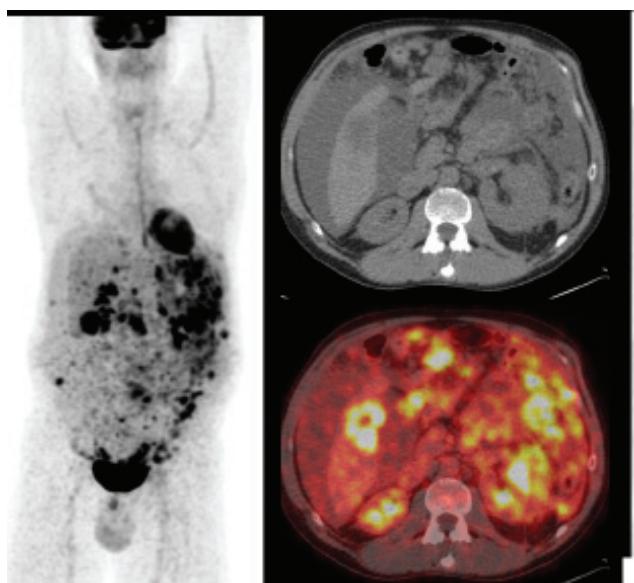
<b>XRCC Model</b>	<b>Drug</b>	<b>Growth inhibition coefficient</b>
XRCC4	Untreated	0.92
	Sunitinib	-0.63
	CB103	-0.21
	Sunitinib+CB103	-0.65
XRCC5	Untreated	1.24
	Sunitinib	-0.60
	CB103	0.57
	Sunitinib+CB103	-0.62

## Supplementary Figure 4

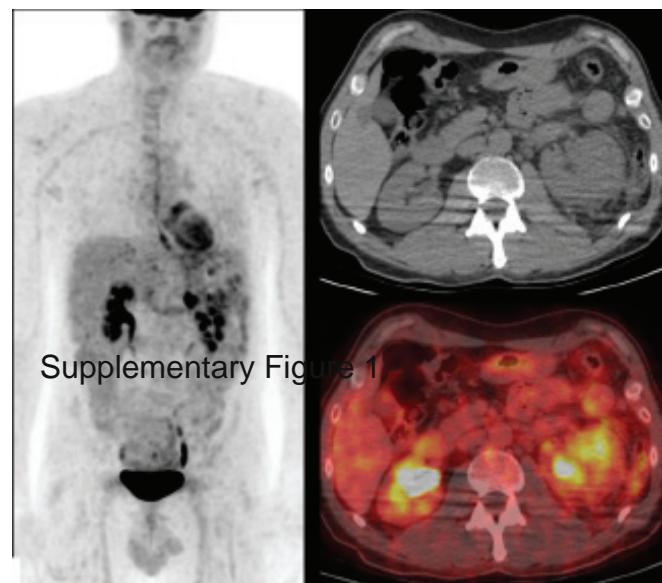
A

Patient (XRCC model 4)

Before treatment sunitinib



After treatment sunitinib

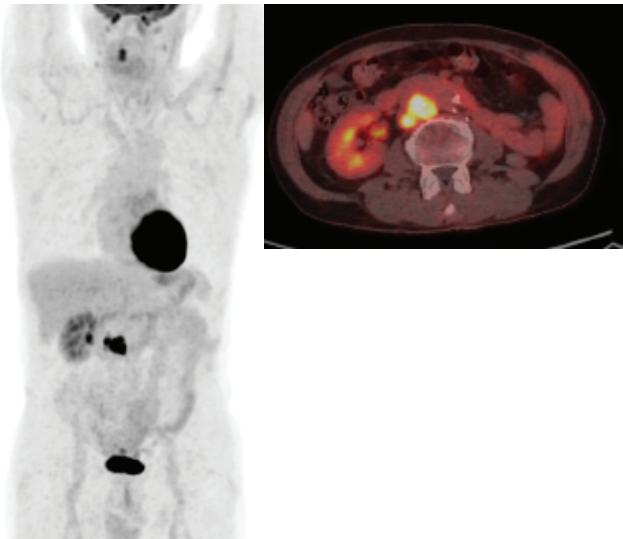


Supplementary Figure 1

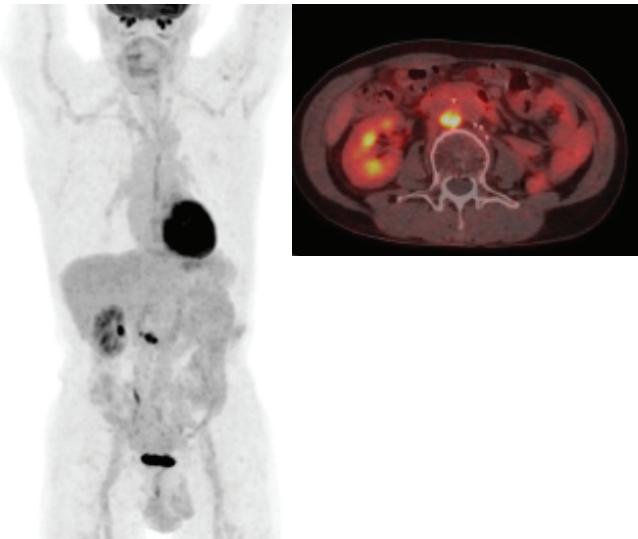
B

Patient (XRCC model 5)

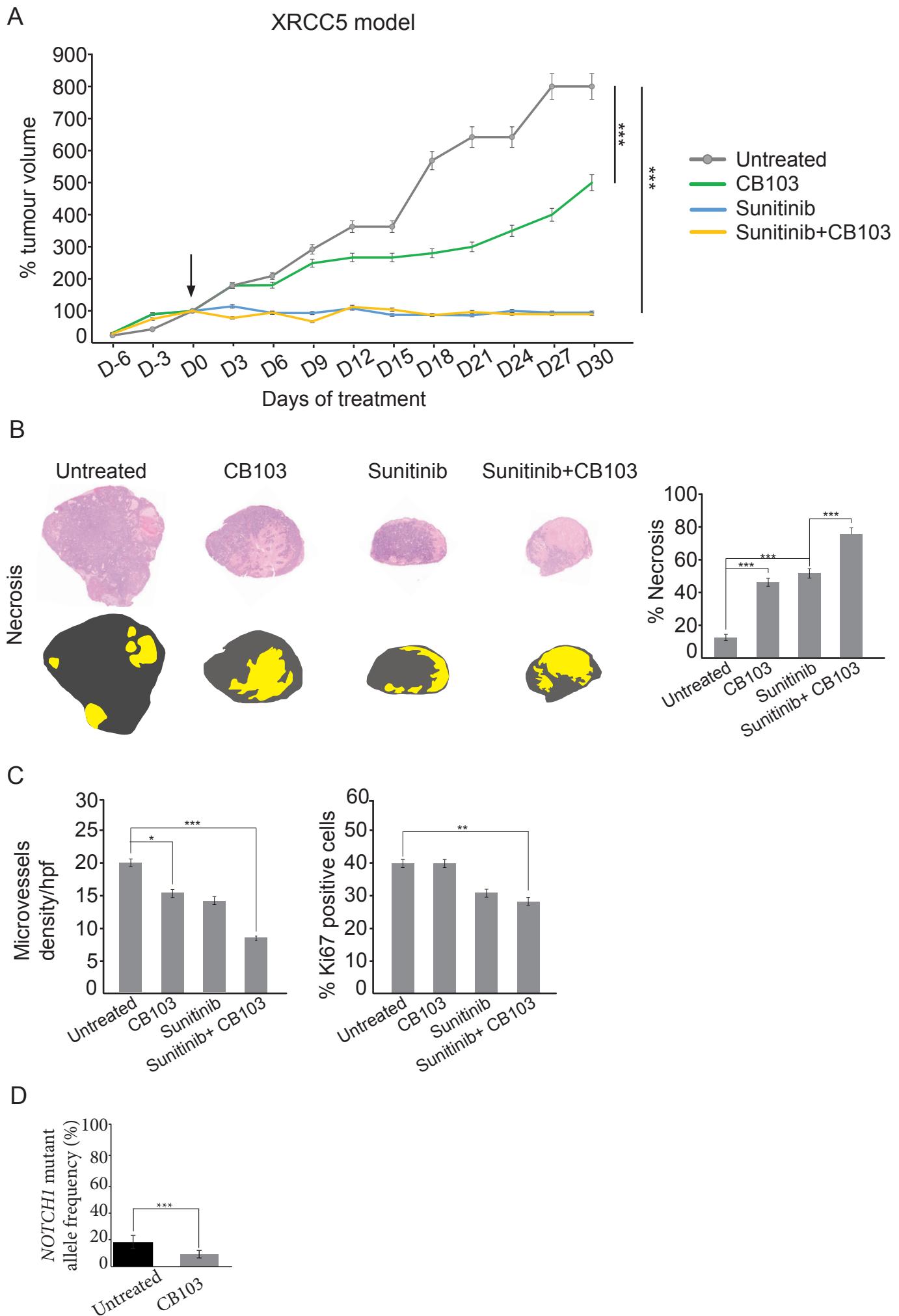
Before treatment sunitinib



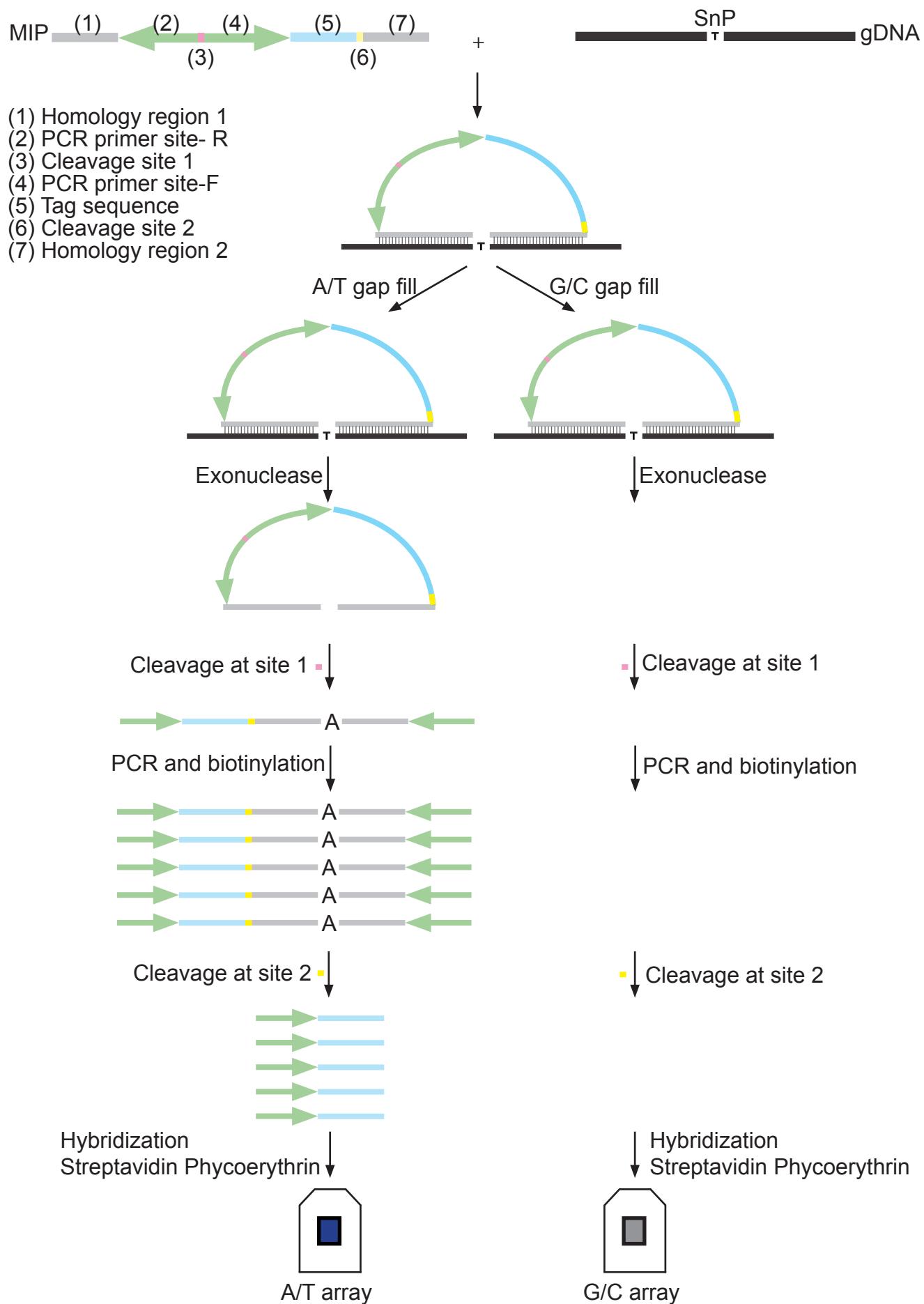
After treatment sunitinib



## Supplementary Figure 5



**Supplementary Figure 6**

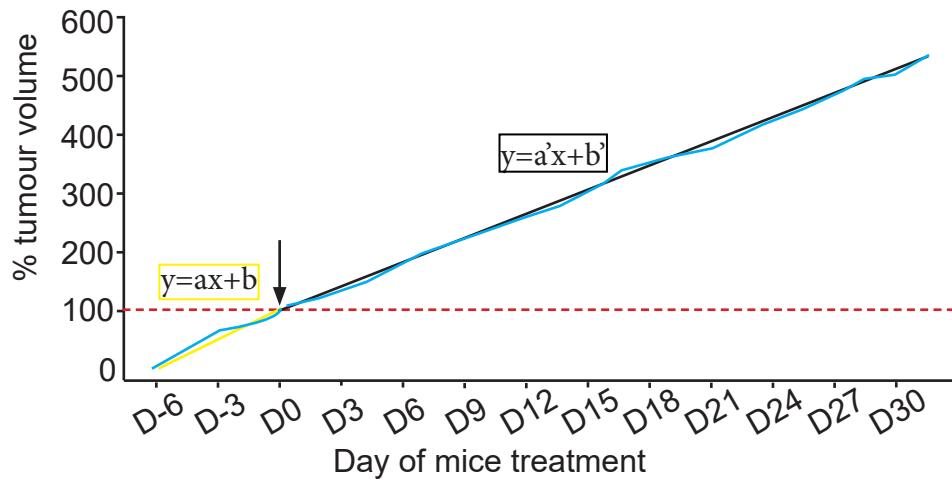


MIP: molecular inversion probe; SnP: Single nucleotide polymorphism; gDNA: genomic DNA

**Supplementary Table 6: Characteristics of the five patient-derived xenograft models**

	Sample from				
	Pre-treatment biopsy	Post-treatment biopsy	Histological type	Furhman grade	Metastatic localizations
HRCC1	+		Clear-cell	3	Lung, bone
HRCC2	+		Clear-cell	2	Lung
HRCC3		+	Clear-cell	4	Bone
HRCC4	+		Clear-cell	4	Lung, liver
HRCC5	+		Clear-cell	4	Lung

**Supplementary Figure 7**



## Supplementary File Excel 1

Assay External Id	Assay Name	0008231_A11	0008231_B02	0008231_B04	0008231_B06
MPL_pW515L_c1544G_T	amp725	4.715312	3.2156634	5.1703324	4.5344191
NRAS_pQ61H_c183A_C	tag100533	-1.0	11.831866	6.3235583	3.1857548
NRAS_pQ61P_c182A_C	tag100535	7.177846	5.2423573	9.2314558	4.1157255
NRAS_pQ61K_c181C_A	amp766	-1.0	-1.0	1.5148214	1.0298412
NRAS_pA18T_c52G_A	amp761	6.4878807	7.5783114	9.921361	2.0321229
NRAS_pG13D_c38G_A	tag100054	6.1034904	5.0451989	8.7258511	9.4866037
NRAS_pG12D_c35G_A	tag100116	2.8997612	3.6545827	0.46187055	4.725688
NRAS_pG12S_c34G_A	tag100117	0.39076245	2.8121858	8.7481365	9.5529995
CDC73_pW43X_c128G_A	amp574	3.1283891	5.7320142	3.2933941	1.3599352
ALK_pR1275Q_c3824G_A	tag110558	0.24737157	7.0684919	5.7840781	5.6996279
ALK_pF1245C_c3734T_G	tag110868	4.4777455	3.0023041	4.6037917	4.1525626
ALK_pF1245V_c3733T_G	tag110869	2.203809	1.6250321	2.8751299	2.2076585
ALK_pT1211T_c3633C_A	tag110564	3.366894	4.5347466	5.3966918	5.3614697
ALK_pF1174V_c3520T_G	tag110780	5.4898958	6.1730876	-1.0	8.5808907
ALK_pD1091N_c3271G_A	tag110829	3.4233489	4.8727627	10.493944	6.3311257
MSH2_p_c1276_plus_1G_A	tag111018	3.514323	7.460587	6.3377099	6.331315
MSH2_pR680X_c2038C_T	tag111013	-1.0	2.9952285	4.464025	0.48083764
MSH2_pR711X_c2131C_T	tag110706	-1.0	3.0463181	11.196543	9.2401018
MSH6_pP1082P_c3246G_T	tag100256	3.7965727	3.7674534	6.6736946	6.4557438
MSH6_pP1087fs3_c3261delC_allele1	tag100257	1.9423587	-1.0	-1.0	0.66997266
MSH6_pP1087fs5_c3261_3262insC_allele1	tag100528	-1.0	-1.0	1.2079544	-1.0
INPP4A_pE940D_c2820A_C	tag110899	7.6677766	10.904262	-1.0	1.6389618
VHL_p_c463_plus_2T_C	tag102376	2.9615827	1.854269	2.6671033	3.3214214
VHL_p_c464_minus_1G_A	amp922	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
VHL_pP61P_c183C_T	amp932	2.5798261	3.570842	4.7809787	1.9753727
VHL_pS65L_c194C_T	amp939	-1.0	2.8369431	-1.0	0.51232553
VHL_pS68X_c203C_A	amp940	-1.0	3.4724393	-1.0	1.4999263
VHL_pP81S_c241C_T	tag100125	6.2188892	6.1329684	7.5856524	5.2167525
VHL_pL85P_c254T_C	tag100080	4.8883162	2.8458502	4.0139437	3.5245829
VHL_pW88X_c263G_A	tag100085	2.6802289	1.7322558	2.5509775	1.3652266
VHL_pQ96X_c286C_T	tag100082	4.2267132	4.2103024	4.2072988	5.1037006
VHL_pG114C_c340G_T	tag100079	3.981343	1.5871989	3.7657022	3.7460265
VHL_pH115Y_c343C_T	tag100216	0.60130012	0.98010075	3.1019924	0.61070293
VHL_pW117R_c349T_C	tag110819	1.7763501	3.2312067	1.7085617	6.355628
VHL_pW117X_c350G_A	tag100219	4.6986504	-1.0	5.277534	4.613358
VHL_pL118P_c353T_C	amp928	-1.0	-1.0	3.4058876	-1.0
VHL_pQ132X_c394C_T	amp934	-1.0	-1.0	-1.0	3.786123
VHL_pI151S_c452T_G	tag100547	11.913697	7.7114406	7.454783	6.2152543
VHL_pL153P_c458T_C	amp929	3.408443	1.7382764	1.607164	2.085146
VHL_p_c463_plus_1G_T	tag102926	1.6795194	2.2557182	1.9121838	2.2615757
VHL_pE160K_c478G_A	tag100546	10.130236	10.970996	1.0460038	8.925602
VHL_pR161X_c481C_T	amp936	-1.0	-1.0	1.9941219	-1.0
VHL_pR167W_c499C_T	amp937	-1.0	-1.0	0.25089329	-1.0
VHL_pS183X_c548C_A	amp938	1.8521118	0.16115491	6.4049487	2.2966156
VHL_pL184P_c551T_C	amp930	2.1277673	2.4690557	1.4861472	5.1382179
VHL_pE189K_c565G_A	amp924	-1.0	0.12727816	0.62124145	1.8589697
TGFBR2_pR497X_c1489C_T	tag110763	4.9730673	6.1395645	8.2267647	8.6719913
MLH1_pC233R_c697T_C	tag110943	3.8034828	11.454423	-1.0	-1.0

MLH1_p_c790_plus_1G_A	tag110997	3.7624173	3.7535877	3.4283509	3.6038532
MLH1_pS556fs14_c1731G_A	tag111027	4.0125561	5.3834896	5.4289908	4.0502343
MLH1_p_c1732_minus_1G_A	tag110729	5.9260025	10.042222	3.953567	2.9745347
CTNNB1_pA5_A80del_c14_24_1del228_allele1	amp605	1.9301199	4.8439956	-1.0	-1.0
CTNNB1_pA13T_c37G_A	amp604	-1.0	-1.0	-1.0	0.67024857
CTNNB1_pD32N_c94G_A	tag100519	6.0162621	7.1839571	4.8743892	5.5870166
CTNNB1_pS33Y_c98C_A	amp609	4.0265732	-1.0	8.3706636	-1.0
CTNNB1_pG34E_c101G_A	tag100244	8.0938406	4.8835945	5.7653227	6.3918295
CTNNB1_pT41A_c121A_G	tag100144	5.9156423	4.3504357	4.7015004	6.1164355
CTNNB1_pT41I_c122C_T	tag100195	3.1362863	1.1824689	1.4571245	2.411267
CTNNB1_pS45P_c133T_C	tag100194	10.051488	7.6128893	1.30922	6.522615
PIK3CA_pR38H_c113G_A	tag102367	-1.0	5.5508652	-1.0	0.50824624
PIK3CA_pR88Q_c263G_A	amp792	6.672256	5.8552337	5.8208294	5.3703308
PIK3CA_pR108H_c323G_A	tag110892	8.0715122	5.0001864	5.9223542	5.4857678
PIK3CA_pG118D_c353G_A	amp784	-1.0	0.5508455	1.099442	2.3392167
PIK3CA_pC420R_c1258T_C	amp778	-1.0	15.961757	-1.0	-1.0
PIK3CA_pE453K_c1357G_A	amp780	2.8571703	8.7695971	1.4238058	7.4576912
PIK3CA_pE542K_c1624G_A	amp781	-1.0	-1.0	1.0634934	-1.0
PIK3CA_pE545K_c1633G_A	amp783	-1.0	3.669868	3.0529962	1.7880006
PIK3CA_pE545A_c1634A_C	tag101384	1.7083176	0.2657125	3.8822658	1.8572738
PIK3CA_pQ546K_c1636C_A	tag101886	2.6409543	4.2478385	5.1911955	8.0006332
PIK3CA_pH701P_c2102A_C	amp787	-1.0	14.093289	-1.0	0.93651354
PIK3CA_pC901F_c2702G_T	amp779	6.0806775	14.592525	5.7978086	3.7671022
PIK3CA_pY1021C_c3062A_G	tag101387	7.8100553	10.181917	5.3030701	7.8585086
PIK3CA_pT1025A_c3073A_G	amp793	0.88616407	4.4239106	0.036534164	5.2073321
PIK3CA_pT1025T_c3075C_T	amp794	5.8186097	3.1965568	3.6297941	6.1554461
PIK3CA_pM1043V_c3127A_G	tag102366	0.57031351	0.83434349	-1.0	0.68522811
PIK3CA_pM1043I_c3129G_T	tag103396	1.6290503	2.4951031	-1.0	3.7677848
PIK3CA_pH1047Y_c3139C_T	amp786	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
PIK3CA_pH1047R_c3140A_G	amp785	-1.0	1.1776801	-1.0	0.22875506
PIK3CA_pG1049S_c3145G_A	tag110926	2.7027984	2.8476224	4.861012	2.1303263
FGFR3_pR248C_c742C_T	tag100033	1.2982364	1.8008673	1.1191629	2.2031486
FGFR3_pS249C_c746C_G_allele1	tag100034	4.2813978	3.8383806	6.0761991	4.2250414
FGFR3_pA369A_c1107G_T	amp657	0.51996541	4.1657658	7.4216986	3.838763
FGFR3_pG370C_c1108G_T	amp659	-1.0	2.4750841	1.7360989	2.1779623
FGFR3_pS371C_c1111A_T_all	tag100103	2.6139414	0.72855145	1.8020378	5.1431317
FGFR3_pY373C_c1118A_G	tag100036	4.815362	3.0114238	4.0926218	0.7284286
FGFR3_pA391E_c1172C_A	amp658	3.8403976	5.6846552	2.5488622	3.0113261
FGFR3_pK650Q_c1948A_C	tag100201	4.0473475	2.922869	4.1281443	5.1193686
FGFR3_pK650M_c1949A_T_all	tag100253	0.099529997	0.19035867	1.1831228	0.80902618
FGFR3_pG697C_c2089G_T	amp660	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
PDGFRA_pN659K_c1977C_A	tag100537	7.0367689	9.5688009	4.2060709	8.0005379
PDGFRA_pT674I_c2021C_T	amp776	-1.0	-1.0	1.7472012	-1.0
PDGFRA_pF808L_c2422T_C	amp773	-1.0	0.5471285	-1.0	1.6745132
PDGFRA_pV824V_c2472C_T	tag100156	1.6946799	1.4743228	1.359647	2.9226305
PDGFRA_pD842Y_c2524G_T	tag100208	4.1080027	3.6669466	2.8921361	3.8935091
PDGFRA_pD842V_c2525A_T_allele1	tag100261	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
PDGFRA_pD846Y_c2536G_T	tag100536	2.7965903	3.6076233	4.4667506	9.6591377
PDGFRA_pN870S_c2609A_G	amp775	-1.0	-1.0	3.6297786	4.6304741

PDGFRA_pD1071N_c3211G_A	amp768	8.1166782	10.999471	0.56775302	11.560527
KIT_pV560D_c1679T_A_allele1	amp698	-1.0	3.4407701	-1.0	-1.0
KIT_pL576P_c1727T_C	amp693	2.4457047	-1.0	0.75908655	-1.0
KIT_pF584S_c1751T_C	amp690	1.1882986	2.7288616	-1.0	-1.0
KIT_pD52N_c154G_A	amp687	0.10192829	4.6117015	3.6956332	-1.0
KIT_pY503_F504insAY_c1509_1510insGCCTAT_allele1	amp705	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
KIT_pW557R_c1669T_C	tag102361	1.4186362	1.2925901	9.1129837	2.0112495
KIT_pW557_K558del_c1669_1674delTGGAAAG_allele1	tag103393	2.4349031	2.6634824	3.8472943	3.4212525
KIT_pV559A_c1676T_C	tag102360	3.1365232	0.23514952	1.9334131	2.4389431
KIT_pP585P_c1755C_T	amp695	5.0711827	3.7318215	-1.0	3.6685567
KIT_pK642E_c1924A_G	tag100525	3.4372444	5.0802393	5.0186729	2.5857177
KIT_pV654A_c1961T_C	tag101882	3.3556929	1.5362495	4.6817985	3.6501477
KIT_pT670I_c2009C_T	amp696	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
KIT_pI798I_c2394C_T	amp691	0.19390063	2.0979249	1.8113177	2.0020506
KIT_pD816Y_c2446G_T	amp688	-1.0	0.21472915	0.90614569	0.24378289
KIT_pN822K_c2466T_G	tag103392	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
KIT_pY823D_c2467T_G	tag103395	3.5525565	1.5059268	0.77178103	0.10563457
KIT_pV825A_c2474T_C	amp701	2.4803984	2.5913918	2.6270554	1.8647524
KIT_pE839K_c2515G_A	amp689	-1.0	-1.0	2.0154369	2.6441789
NFKB1_p_c40_minus_1G_A	tag111038	4.9048414	4.3392534	3.8039694	1.6507534
FBXW7_pS582L_c1745C_T	amp654	-1.0	-1.0	3.0042706	-1.0
FBXW7_pR505C_c1513C_T	amp653	0.14483526	1.0869892	1.7518144	1.722743
FBXW7_pR479Q_c1436G_A	tag100250	5.7233233	8.6282282	3.6080718	7.2412219
FBXW7_pR465H_c1394G_A	tag101374	-1.0	4.311121	6.7530756	0.86324865
FBXW7_pR465C_c1393C_T	tag101878	3.7522552	5.1899581	2.4020441	0.67157382
FBXW7_pR393X_c1177C_T	amp649	0.50855368	2.2462275	3.138818	4.2195201
FBXW7_pR278X_c832C_T	tag101877	5.9552798	9.9434624	-1.0	4.2651691
FBXW7_pR224X_c670C_T	amp647	6.8153214	-1.0	-1.0	-1.0
PIK3R1_pG376R_c1126G_A	tag111045	2.396462	-1.0	-1.0	5.1980128
APC_pR213X_c637C_T	amp541	6.8793902	15.335615	-1.0	0.39951494
APC_pR232X_c694C_T	amp542	0.21506403	5.1993995	0.13696843	-1.0
APC_p_c835_minus_8A_G	tag103834	2.55022	1.9039376	0.76332653	-1.0
APC_pR283X_c847C_T	tag102907	3.9992604	6.3955097	5.4047165	5.9995017
APC_pR302X_c904C_T	amp544	-1.0	8.4363461	2.8463769	4.439518
APC_pR332X_c994C_T	amp545	3.0582268	2.9301331	3.3475432	3.1721537
APC_pR564X_c1690C_T	amp546	3.4968877	3.8044283	3.3832109	3.8126316
APC_pQ789X_c2365C_T	amp538	-1.0	12.948635	-1.0	3.0206339
APC_pE853X_c2557G_T	amp527	4.0834827	3.8900321	5.4938979	12.45909
APC_pR876X_c2626C_T	amp547	3.0505126	5.3630776	6.7435594	1.9887793
APC_pR1114X_c3340C_T	amp539	3.2608812	-1.0	1.7139647	-1.0
APC_pS1281X_c3842C_A	tag103835	2.7419441	4.4500012	4.8764057	3.87767
APC_pE1286X_c3856G_T	tag101869	4.6299319	5.4767933	1.3400291	6.031918
APC_pQ1291X_c3871C_T	tag101366	3.6345558	4.3280406	3.4629202	3.441828
APC_pQ1294X_c3880C_T	tag110857	1.6563731	2.2111874	3.9867039	2.0947223
APC_pE1309fs4_c3921_3925deAAAAG_allele1	tag102352	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
APC_pE1309fs6_c3923_3924insA_allele1	tag102905	0.21834746	0.3077679	-1.0	0.71069103
APC_pE1309X_c3925G_T	tag102906	2.649699	2.5815907	2.9156764	3.3845406
APC_pE1309fs4_c3927_3931deAAAGA_allele1	amp514	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
APC_pE1322X_c3964G_T	tag100185	1.3317435	4.1013451	3.1469066	5.8842015

APC_pQ1328X_c3982C_T	tag100516	3.0046873	4.6843629	5.5563679	6.195281
APC_pQ1338X_c4012C_T	amp531	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
APC_pS1341R_c4023T_G	tag100241	2.7032561	1.3583231	4.982688	3.1460266
APC_pE1345X_c4033G_T	tag100935	4.9574628	6.5366454	1.889539	1.8079422
APC_pE1353X_c4057G_T	tag100240	3.6553931	1.4643881	5.1967311	4.3034673
APC_pQ1367X_c4099C_T	tag100186	10.073657	15.155195	0.4921948	13.898117
APC_pQ1378X_c4132C_T	tag100517	3.7467687	2.270848	2.0424893	1.7787983
APC_pE1379X_c4135G_T	tag101363	1.3239744	1.701221	0.83877367	1.860945
APC_pQ1429X_c4285C_T	amp535	1.3412848	-1.0	7.0545053	-1.0
APC_pQ1447X_c4339C_T	tag100187	1.9748095	5.7886057	4.7981219	6.2905588
APC_pR1450X_c4348C_T	amp540	-1.0	-1.0	0.81115222	-1.0
APC_pE1451X_c4351G_T	tag100936	2.4327915	2.924382	4.0245795	6.243432
APC_pE1464X_c4390G_T	amp526	0.94225311	2.4215996	3.1903069	2.4079244
APC_pS1465fs3_c4393_4394d_e1AG_allele1	tag100139	3.6186104	2.3371902	3.7384958	2.9039323
APC_pQ1469X_c4405C_T	tag100188	1.2930486	1.4207978	0.67695636	2.494729
APC_pG1499X_c4495G_T	amp528	-1.0	6.8949509	-1.0	5.0500059
APC_pT1537K_c4610C_A	amp552	-1.0	2.5699933	0.96146256	1.376701
APC_pT1556fs3_c4660_4661in_sa_allele1	tag101875	2.288094	1.162672	1.9105724	3.4987736
APC_pT1556fs3_c4666_4667in_sa_allele1	tag102908	3.2822046	3.4186351	0.6293813	3.1959176
APC_pE1577X_c4729G_T	tag111029	2.309252	2.9343965	1.8688974	4.4372606
APC_pE1397X_c4189G_T	amp523	4.1473598	4.6382451	5.4620128	4.0148191
APC_pQ1406X_c4216C_T	tag100136	1.5458071	0.36338162	2.1215911	3.2467895
APC_pE1408X_c4222G_T	amp524	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
CSF1R_pY969X_c2907T_G	tag100193	1.8068103	0.47227362	-1.0	0.54844928
CSF1R_pY969C_c2906A_G	tag100099	1.4146131	1.0592575	-1.0	2.3924537
CSF1R_pY969H_c2905T_C	amp602	1.4990162	2.2603347	0.78425193	3.0436773
CSF1R_pL301S_c902T_C	tag100142	5.968153	4.2591896	3.9746225	5.2421479
NPM1_pW288fs12_c863_864in_scATG_allele1	tag101379	11.110229	13.289408	9.2349854	8.6655998
NPM1_pW288fs12_c863_864in_scCTG_allele1	tag101380	6.0793452	10.774143	4.362699	6.5179377
NPM1_pW288fs12_c863_864in_stCTG_allele1	tag101381	4.0119081	18.580753	3.5845828	6.4979801
EGFR_pR108K_c323G_A	amp637	1.6274734	-1.0	7.2979374	-1.0
EGFR_pT263P_c787A_C	amp640	0.82369918	-1.0	-1.0	-1.0
EGFR_pA289V_c866C_T	amp613	-1.0	-1.0	1.9162719	-1.0
EGFR_pL861Q_c2582T_A_allele1	tag100023	1.1502523	0.16874506	2.3226192	1.1569914
EGFR_pL861R_c2582T_G	tag110695	5.5922756	8.3274174	5.7331076	6.659976
EGFR_pG863D_c2588G_A	amp625	3.9516168	3.1254005	4.3633738	5.1880298
EGFR_pG598V_c1793G_T	amp623	0.011531563	5.6206093	5.1442919	6.592669
EGFR_pR677H_c2030G_A	amp638	3.7046366	1.331018	5.5539236	7.0208716
EGFR_pE709K_c2125G_A	tag102916	0.082146376	2.1767919	-1.0	0.54982334
EGFR_pE709A_c2126A_C	amp615	-1.0	3.0148728	0.83932555	-1.0
EGFR_pG719S_c2155G_A	tag100523	2.0171101	4.0565991	-1.0	3.1220157
EGFR_pG719C_c2155G_T	tag110607	0.48608652	2.3922338	3.0426564	4.465054
EGFR_pE746_A750del_c2235_2249del15_allele1	tag101372	2.8095853	1.6553614	2.5778377	2.3058782
EGFR_pE746_A750del_c2236_2250del15_allele1	amp619	3.7485301	1.5366725	-1.0	1.746617

EGFR_pE746_S752_V_c2237_2255_T_allele1	amp621	1.8472283	3.9947832	2.9710414	2.8347631
EGFR_pL747_A750_P_c2239_2248TTAAGAGAAG_C_allele1	amp626	-1.0	-1.0	1.2728218	0.26669416
EGFR_pL747_T751del_c2240_2254del15_allele1	amp630	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
EGFR_pL747_P753_S_c2240_2257del18_allele1	tag102359	3.1446867	3.4097483	4.6205111	7.6289039
EGFR_pD761Y_c2281G_T	tag100521	4.1719608	2.3625135	5.8142118	-1.0
EGFR_pS768I_c2303G_T	amp639	4.0304279	-1.0	-1.0	-1.0
EGFR_pV774M_c2320G_A	tag100029	-1.0	3.008472	2.7118821	0.23256268
EGFR_pT790M_c2369C_T	amp641	1.2825369	0.42156351	-1.0	6.164412
EGFR_pV819V_c2457G_A	amp643	-1.0	-1.0	1.6541238	-1.0
EGFR_pL833V_c2497T_G	amp632	1.2530204	4.3427191	-1.0	0.50444323
EGFR_pL858M_c2572C_A	tag100247	1.2014681	1.2544098	2.3694205	2.2754691
EGFR_pL858R_c2573T_G	tag100199	2.8902497	2.0311236	0.67410594	2.0439184
BRAF_pL618W_c1853T_G	tag110927	1.8213624	2.2215366	3.3710418	2.8774118
BRAF_pV600E_c1799T_A_allele1	tag100941	4.0156093	3.6189075	4.14921	5.4804411
BRAF_pV600K_c1798_1799GT_AA_allele1	tag101368	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
BRAF_pV600R_c1798_1799GT_AG_allele1	tag101370	0.93571705	0.090768978	-1.0	1.6360016
BRAF_pD594G_c1781A_G	tag101876	0.85514265	1.2250412	2.3922396	0.78724307
BRAF_pF583F_c1749T_C	tag110980	1.5963376	1.1983817	-1.0	-1.0
BRAF_pG469E_c1406G_A	tag102358	3.9620154	2.7542276	4.5330844	5.1129518
BRAF_pG469R_c1405G_A	tag102913	4.7827516	5.769496	7.1226788	6.536335
BRAF_pG466E_c1397G_A	tag102357	3.4098654	1.9104794	3.488512	2.4515209
BRAF_pG464E_c1391G_A	tag102356	5.2498136	4.7278366	5.4325113	3.055263
BRAF_pI326T_c977T_C	tag110747	2.3090792	1.8625298	2.6100481	2.1597972
FGFR1_pP252T_c754C_A	tag100030	2.3064866	2.590827	4.2366953	2.8671572
FGFR1_pS125L_c374C_T	tag100252	-1.0	3.6697099	5.2093663	4.7146297
IKBKB_pA360S_c1078G_T	tag110653	1.5254511	4.1863689	5.7105923	3.0519636
JAK2_pK191Q_c571A_C	tag110956	4.5902915	-1.0	-1.0	2.6174326
JAK2_pY570Y_c1710C_T	tag110659	-1.0	9.4524221	4.576097	2.1391671
JAK2_pV617F_c1849G_T	amp686	-1.0	2.8673549	2.5011857	-1.0
JAK2_pR683G_c2047A_G	tag110929	2.9006131	2.5519302	1.7111701	2.3969231
CDKN2A_p_c457_plus_2T_C	amp581	-1.0	2.8780866	-1.0	-1.0
CDKN2A_p_c457_plus_1G_T	tag100191	4.8647451	6.0700169	8.7165298	5.4539976
CDKN2A_pR131H_c392G_A	tag100015	1.4897457	1.7698549	2.2490716	1.8440312
CDKN2A_p_c150_plus_2T_C	tag100005	-1.0	7.1137905	-1.0	5.2120147
CDKN2A_pA30V_c89C_T	tag100006	2.9530604	3.251719	-1.0	4.3298812
CDKN2A_pE26X_c76G_T	tag100009	0.23163874	0.27537903	-1.0	0.02217019
CDKN2A_pW15X_c44G_A	tag100021	2.1446373	1.209826	2.6485987	2.2171378
CDKN2A_p_c1_minus_25C_T	tag100004	0.8927114	0.68273348	-1.0	0.35065103
CDKN2A_pE120K_c358G_A	tag100008	1.9416718	3.5064368	6.0823941	6.0885167
CDKN2A_pW110X_c330G_A	tag100020	1.2556474	1.3520632	2.337323	1.6933926
CDKN2A_pW110X_c329G_A	tag100019	3.0053649	4.5191555	8.8266935	4.6578565
CDKN2A_pD108N_c322G_A	tag100007	2.8684843	7.6408601	10.115907	7.3545609
CDKN2A_pE88E_c264G_A	tag100012	3.8223219	4.1103549	4.2181177	3.3410096
CDKN2A_pH83Y_c247C_T	amp590	1.7391677	1.8753943	-1.0	3.0815825
CDKN2A_pR80X_c238C_T	amp594	-1.0	1.2208723	-1.0	2.0021486
CDKN2A_pE69X_c205G_T	tag100011	2.0562224	2.1947	3.2518766	1.2053175
CDKN2A_pE61X_c181G_T	tag100010	1.1955116	-1.0	-1.0	2.5210226

CDKN2A_pR58X_c172C_T	tag100016	2.7450259	2.664448	4.8553066	2.5880895
CDKN2A_p_c151_minus_1G_A	tag100190	5.4098244	7.3096824	10.698084	6.5320048
CDKN2A_pP48L_c143C_T	tag100140	1.5357437	2.5414815	1.7135255	2.1156108
CDKN2A_pY44X_c132C_A	tag100141	1.4207458	-1.0	0.3250145	-1.0
CDKN2A_pS43I_c128G_T	tag100018	0.21299344	0.68616164	0.5296551	0.77851689
CDKN2A_pG35E_c104G_A	tag100013	1.7117289	0.58721602	1.0234272	2.04845
PTCH1_pW1018X_c3054G_A	amp799	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
PTCH1_pM561R_c1682T_G	tag100209	2.2891228	2.8896642	1.7064266	2.7073355
PTCH1_pQ417X_c1249C_T	amp798	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
PTCH1_pQ365X_c1093C_T	tag100265	1.1626531	4.1887078	6.222661	3.0967648
ABL1_pG250E_c749G_A	tag100002	0.3383365	-1.0	0.47679371	1.0894886
ABL1_pY253H_c757T_C	tag100003	2.3821316	1.5543668	3.8180478	4.3470154
ABL1_pE255K_c763G_A	amp501	2.6779854	2.6102099	4.4314089	3.785938
ABL1_pF311L_c931T_C	tag100932	1.0110316	0.98301983	1.155702	1.0779891
ABL1_pT315I_c944C_T	amp508	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
ABL1_pM351T_c1052T_C	tag100239	8.4482784	6.7246056	7.4589696	10.259717
ABL1_pE355G_c1064A_G	tag100931	3.3317695	2.976619	-1.0	4.7112117
ABL1_pF359V_c1075T_G	amp504	12.206912	12.168715	12.179368	15.640723
ABL1_pH396R_c1187A_G	tag100098	1.7882671	-1.0	2.0170276	1.1907475
NOTCH1_pQ2460X_c7378C_T	tag100115	6.1800966	9.594451	8.3859415	7.1513433
NOTCH1_pL1679P_c5036T_C	amp753	-1.0	2.2098563	-1.0	-1.0
NOTCH1_pL1601P_c4802T_C	tag100053	6.0505795	4.4104609	4.4741015	4.2219672
NOTCH1_pL1594P_c4781T_C	tag100114	3.8332214	1.2946441	3.8836215	3.5258496
NOTCH1_pL1586P_c4757T_C	tag100052	2.0388157	0.59755343	6.5952029	1.8427449
NOTCH1_pL1575P_c4724T_C	tag100051	8.8988752	11.46299	21.157406	0.30800349
RET_pC634R_c1900T_C	amp861	0.18909976	2.5509543	1.0369651	1.468172
RET_pC634Y_c1901G_A	tag100056	3.9867551	3.3244674	4.9566865	3.5750253
RET_pA664D_c1991C_A	amp860	7.8487358	-1.0	4.1788812	6.6748695
RET_pM918T_c2753T_C	amp863	1.0762515	28.379164	0.4172911	0.87443465
PTEN_pE7X_c19G_T	tag101388	3.83867	5.2607164	6.4623303	5.7798491
PTEN_pR15I_c44G_T	amp837	0.21982267	0.13176776	1.958859	3.7921784
PTEN_pQ17X_c49C_T	tag101895	5.2173271	7.6452417	1.1571163	7.6255131
PTEN_pL23F_c69A_C	tag101892	5.9895911	3.5821576	3.0607424	3.6960518
PTEN_pP38S_c112C_T	tag101893	2.5145977	3.127214	1.769383	2.6935389
PTEN_pL42R_c125T_G	tag100539	6.2779517	3.4731169	5.4840574	7.8632321
PTEN_p_c165_minus_2A_C	tag104692	9.3887053	10.152415	2.9285612	10.37822
PTEN_pH61R_c182A_G	tag104818	5.6496282	3.2202787	5.0587649	5.1216974
PTEN_pY68H_c202T_C	amp844	3.9527364	4.3153472	-1.0	3.2735472
PTEN_p_c209_plus_5G_A	tag104693	7.7644043	5.3938732	4.9132147	2.9302137
PTEN_p_c253_plus_1G_A	amp803	1.613973	3.6415157	-1.0	5.0836101
PTEN_p_c253_plus_1G_T	tag110963	6.2743516	2.7403085	-1.0	-1.0
PTEN_pH93Y_c277C_T	amp815	4.1796551	3.7879021	3.0092728	4.7270594
PTEN_pH93Q_c279T_G	amp814	4.1025286	-1.0	-1.0	-1.0
PTEN_pP95L_c284C_T	tag102371	2.2715237	2.4656527	3.0818932	4.4680634
PTEN_pI101T_c302T_C	tag101391	11.177982	16.775719	4.6410828	13.914928
PTEN_pD107Y_c319G_T	amp806	3.2321513	5.7856674	4.236351	3.2510374
PTEN_pQ110X_c328C_T	amp828	4.1983314	3.4152589	5.8522096	4.6311355
PTEN_pA126T_c376G_A	tag100266	4.5765944	5.2682443	0.70807135	4.4144769
PTEN_pG129R_c385G_A	amp810	7.0385723	1.7964718	-1.0	-1.0
PTEN_pR130X_c388C_T	amp836	0.97722471	3.2154267	0.84503305	2.5750287
PTEN_pR130Q_c389G_A	amp835	2.327548	4.7700853	-1.0	1.3839487
PTEN_pA151T_c451G_A	tag102923	7.3619432	5.2005992	2.5600033	4.8895268

PTEN_pY155C_c464A_G	tag100267	4.7425146	1.7659824	5.9213209	6.6655512
PTEN_pG165R_c493G_A	tag101890	8.2186365	6.0418129	3.7275736	7.6975784
PTEN_pQ171X_c511C_T	tag100540	6.0470204	9.0957823	0.20199156	7.4432244
PTEN_pR173C_c517C_T	amp838	3.284327	19.313326	-1.0	6.7416968
PTEN_pR173H_c518G_A	amp839	-1.0	-1.0	2.2258396	4.5127497
PTEN_pY174D_c520T_G	tag110875	4.9055228	1.5967996	-1.0	1.223527
PTEN_pQ214X_c640C_T	tag100957	4.9932947	3.3706989	6.6512527	0.16245227
PTEN_pQ219X_c655C_T	tag101393	5.7246895	6.8594012	5.8551421	4.8145204
PTEN_pR233X_c697C_T	tag100542	9.0803185	7.8464828	8.7181501	4.7567997
PTEN_pE235X_c703G_T	amp807	4.816524	13.704489	11.628378	5.5019631
PTEN_pQ245X_c733C_T	amp833	-1.0	-1.0	-1.0	0.97267723
PTEN_pP246L_c737C_T	tag101392	3.586293	0.42101896	4.5495157	5.5401487
PTEN_pG251C_c751G_T	tag101891	5.6176987	7.9137998	-1.0	6.7910557
PTEN_pK267fs9_c800delA_all	tag103839	7.9739084	6.1427927	7.6627884	7.3395553
le1					
PTEN_pW274X_c822G_A	tag104229	4.6508536	4.9625807	2.8655429	4.9167995
PTEN_pQ298X_c892C_T	amp834	-1.0	-1.0	9.5298119	-1.0
PTEN_pE299X_c895G_T	amp808	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
PTEN_pN323fs2_c968_969ins	tag104819	0.49020663	1.0641698	-1.0	1.7703191
A_allele1					
PTEN_pN323fs21_c968delA_all	tag104821	1.0470986	1.0950314	1.446828	1.0125182
ele1					
PTEN_pR335X_c1003C_T	tag103841	3.5070531	3.7739718	4.5068994	4.619235
PTEN_p_c1026_plus_1G_T	amp800	3.816103	5.8192167	4.8800759	5.2536316
PTEN_p_c1027_minus_2A_G	tag111023	6.8050981	7.8914495	9.0598259	4.6123962
FGFR2_pN549K_c1647T_G	tag110880	6.0147581	7.5673985	-1.0	8.6588736
FGFR2_pE475K_c1423G_A	tag110881	1.2342246	-1.0	-1.0	-1.0
FGFR2_pC382R_c1144T_C	tag110882	5.7857804	9.2213497	4.5091543	3.0363917
FGFR2_pY375C_c1124A_G	tag110800	0.83803833	4.5635982	-1.0	6.3565249
FGFR2_pK310R_c929A_G	tag110681	8.3483315	4.836112	7.5902162	6.3645191
FGFR2_pR203C_c607C_T	tag110728	-1.0	7.3333611	0.62955451	-1.0
HRAS_pQ61H_c183G_T	tag100041	1.1427735	1.2792161	2.5278351	2.1600988
HRAS_pQ61P_c182A_C	tag100043	2.3224895	3.0061436	2.3193045	6.3636413
HRAS_pQ61K_c181C_A	tag100042	0.99343824	1.7612363	2.2766242	3.1319346
HRAS_pG13D_c38G_A	tag100039	4.0865541	4.0209808	4.7709494	6.5383072
HRAS_pG13S_c37G_A	tag100040	0.64133716	3.7470844	5.045301	4.693758
HRAS_pG12D_c35G_A	amp679	6.0406032	4.3874216	4.847971	2.291028
HRAS_pG12S_c34G_A	tag100038	4.2826867	7.4213438	6.9243636	9.7063446
WT1_pR394W_c1180C_T	tag100127	4.4447794	2.5887558	0.62400228	2.6657155
WT1_pR390X_c1168C_T	amp943	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
WT1_pG379V_c1136G_T	tag110945	2.0511022	2.2323954	1.732111	2.1717517
WT1_pR362X_c1084C_T	tag110885	0.37593707	0.98181307	0.93152112	2.6025014
WT1_pS313X_c938C_A	tag110640	-1.0	0.26615152	0.82751161	0.64702117
WT1_pR301X_c901C_T	tag110776	3.6716416	2.2002177	0.71911854	4.2617269
WT1_pF154S_c461T_C	tag110755	-1.0	6.6108384	1.376102	1.9229527
WT1_pS46X_c137C_A	tag100086	1.1329031	-1.0	-1.0	-1.0
MEN1_pW471X_c1413G_A	tag100046	1.2535816	4.8108983	7.2509985	5.4657817
MEN1_p_c654_plus_3A_G	tag100044	10.811992	3.342823	20.180695	9.5618382
MEN1_pR98X_c292C_T	amp718	4.0528774	-1.0	-1.0	3.203716
ATM_pR337C_c1009C_T	tag110556	-1.0	2.5221877	-1.0	1.4035504
ATM_pR337S_c1009C_A	tag110559	-1.0	1.8820713	-1.0	-1.0
ATM_pV410A_c1229T_C	tag110939	3.1166046	3.3842905	1.1405059	0.33856678
ATM_pP604S_c1810C_T	amp558	2.2232351	0.81359965	1.1805286	3.5102947

ATM_pS707P_c2119T_C	tag111024	1.9401561	2.4169104	-1.0	0.74662018
ATM_pF858L_c2572T_C	amp557	2.2064955	2.5322068	3.1269369	1.9670857
ATM_pA1309T_c3925G_A	tag110600	1.1978571	0.39477766	5.6318154	2.6399846
ATM_pI1681V_c5041A_G	tag110877	2.7681978	7.0119982	-1.0	5.4044309
ATM_pQ2442P_c7325A_C	tag110796	1.183602	4.5587158	2.5455868	1.1411361
ATM_pR2443Q_c7328G_A	amp559	-1.0	0.95654786	3.1675062	5.1036477
ATM_pT2666A_c7996A_G	tag110994	4.1678772	3.4894631	2.9038458	1.4267812
ATM_pG2867E_c8600G_A	tag110942	-1.0	-1.0	5.8977313	5.8827281
ATM_pR3008C_c9022C_T	amp560	1.6099049	4.0586977	7.1071382	0.032016981
ATM_pR3008H_c9023G_A	amp561	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
ATM_pR3047X_c9139C_T	amp562	-1.0	4.6290483	3.0190291	-1.0
CBL_pY371H_c1111T_C	tag110995	0.46986869	5.1789341	-1.0	4.3840289
CBL_pV391I_c1171G_A	tag110878	0.76087421	3.8086128	2.5267026	4.8693733
CBL_p_c1228_minus_2A_G	tag110799	3.0143268	1.8443608	5.319056	3.8808548
CBL_pR420Q_c1259G_A	tag110879	5.0868039	11.394435	7.0315576	10.561402
KRAS_pA146T_c436G_A	amp708	-1.0	-1.0	1.7506852	-1.0
KRAS_pQ61H_c183A_C	tag100204	4.1912932	6.8515077	1.7886328	8.4905157
KRAS_pQ61P_c182A_C	tag100154	5.8598995	6.0760899	1.6073655	7.5892248
KRAS_pQ61K_c181C_A	amp715	8.4653759	9.39291	14.435107	0.2021064
KRAS_pA59T_c175G_A	amp709	2.5708971	-1.0	-1.0	0.46460411
KRAS_pG13D_c38G_A	amp712	3.1482871	3.9378211	2.251389	5.2750626
KRAS_pG13S_c37G_A	tag100106	2.0763445	0.053069931	0.25576732	-1.0
KRAS_pG12D_c35G_A	tag100152	4.5467324	5.0279102	4.8103886	4.1520524
KRAS_pG12S_c34G_A	tag100153	-1.0	-1.0	7.743804	-1.0
PTPN11_pG60V_c179G_T	amp849	4.0000615	2.3982854	2.4293981	2.3624213
PTPN11_pD61Y_c181G_T	amp846	2.7428596	1.9980229	3.7671511	3.7313683
PTPN11_pA72T_c214G_A	amp845	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
PTPN11_pE76K_c226G_A	tag101396	2.9892204	5.8623343	3.5918603	7.1727109
PTPN11_pS502P_c1504T_C	tag100118	6.2668552	8.3912859	6.5238733	7.5313096
PTPN11_pG503V_c1508G_T	tag100158	3.1183329	-1.0	3.6353574	1.636174
HNF1A_pW206L_c617G_T	amp678	-1.0	1.0964133	-1.0	-1.0
HNF1A_pW206C_c618G_T	tag100150	4.2171078	4.6315088	3.9305677	5.786479
FLT3_pD835E_c2505T_G	tag100948	1.3811764	1.3090899	4.1583219	3.5111737
FLT3_pD835V_c2504A_T_allele1	tag101375	7.8998733	6.4126415	3.8403051	0.65960544
FLT3_pD835N_c2503G_A	tag101879	3.8428545	2.7995455	4.1129847	3.0501354
FLT3_pL561L_c1683A_G	amp674	-1.0	-1.0	2.0248218	0.89983338
BRCA2_pR18H_c53G_A	tag111019	1.2547346	-1.0	0.45327356	-1.0
BRCA2_pE187K_c559G_A	tag110830	0.16803387	-1.0	-1.0	0.15122327
BRCA2_pT630I_c1889C_T	tag110870	1.6111081	5.0487971	3.1481924	-1.0
BRCA2_pP920S_c2758C_T	tag110933	-1.0	5.1689649	8.3979425	6.154789
BRCA2_pI1017S_c3050T_G	tag110901	4.1522031	9.2744923	-1.0	8.3246937
BRCA2_pG1338G_c4014C_T	tag111033	4.8159943	3.9114017	3.7748053	7.2073131
BRCA2_pE1593X_c4777G_T	tag110902	3.3670585	2.723928	3.008358	5.3947144
BRCA2_pS1682S_c5046T_C	tag110598	10.805107	10.242161	2.7483714	12.683793
BRCA2_pV1988I_c5962G_A	tag110609	-1.0	2.7194493	3.860399	0.65190262
BRCA2_pH2415N_c7243C_A	tag110626	2.5428014	1.6497654	2.9774606	3.3341763
BRCA2_pR2678S_c8034G_T	tag110959	-1.0	10.159115	14.651917	11.156391
BRCA2_pR2787H_c8360G_A	tag110592	2.6879289	1.2392507	2.5280139	0.018753842
BRCA2_pR2842C_c8524C_T	tag111014	3.6016223	9.9375	3.1841011	4.9018173
BRCA2_pQ2934X_c8800C_T	tag110985	6.933641	0.57287472	-1.0	4.9078822
BRCA2_pD3095E_c9285C_A	tag110606	1.4314215	6.652616	6.0841994	6.2951789
BRCA2_pI3103M_c9309A_G	tag110645	5.6876416	-1.0	2.1910319	1.303641

BRCA2_pR3128X_c9382C_T	tag110593	2.1478226	6.2456193	7.5950751	7.4034481
RB1_pE54X_c160G_T	tag110986	-1.0	5.2309518	6.417531	2.6634381
RB1_pS82X_c245C_A	tag110934	2.1181235	8.5939217	4.1031675	0.86738658
RB1_p_c380_plus_1G_A	tag110743	4.1406803	3.4056935	6.1307111	3.996191
RB1_pE137X_c409G_T	amp853	2.9886854	2.3103228	4.6616693	-1.0
RB1_pQ217X_c649C_T	tag110960	2.8591058	2.7502103	0.16446117	4.3687701
RB1_pR251X_c751C_T	tag110831	0.3293134	6.6232886	5.629643	12.371955
RB1_pR320X_c958C_T	amp854	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
RB1_pR358X_c1072C_T	amp855	-1.0	6.1359415	3.5826154	5.2610106
RB1_pQ395X_c1183C_T	tag110637	-1.0	3.5078981	8.0180254	-1.0
RB1_p_c1215_plus_1G_A	amp851	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
RB1_pE440X_c1318G_T	tag110620	1.1571538	3.9821332	-1.0	9.4375782
RB1_pR445X_c1333C_T	tag111020	4.4901438	3.6112013	2.5587659	6.3619204
RB1_pR455X_c1363C_T	amp856	1.5634054	6.2511315	5.8093634	3.9290056
RB1_p_c1499_minus_1G_T	tag104842	-1.0	-1.0	-1.0	2.2931967
RB1_pR552X_c1654C_T	tag104230	0.92421442	2.0150666	2.5146451	2.117538
RB1_pR556X_c1666C_T	tag101897	-1.0	0.2828919	3.5485628	2.3073046
RB1_pR579X_c1735C_T	amp859	0.68801588	6.7851896	6.7133331	9.6190376
RB1_p_c1961_minus_1G_A	tag110904	7.867053	7.9489975	8.5878305	12.012525
RB1_pQ685X_c2053C_T	tag110784	-1.0	4.013752	5.4545093	5.4177403
RB1_pQ702X_c2104C_T	tag110649	11.201917	13.032303	5.5824814	12.015815
RB1_p_c2107_minus_2A_G	tag111042	9.1658831	10.596729	-1.0	13.489717
RB1_pE748X_c2242G_T	tag110625	4.8609915	4.0306535	3.774087	3.2172129
RB1_p_c2326_minus_2A_C	tag110871	7.4302096	9.0563622	-1.0	10.662297
RB1_pR787X_c2359C_T	tag110872	-1.0	14.410912	12.722295	7.8245034
TSHR_pM453T_c1358T_C	amp918	0.57215446	12.56707	8.2162628	6.2711711
TSHR_pA623S_c1867G_T	tag100960	-1.0	4.8365779	2.8674498	3.0705907
TSHR_pA623V_c1868C_T	tag101398	1.1538335	2.9937618	2.3411024	2.6565018
TSHR_pI630L_c1888A_C	tag100545	3.3963213	3.9102638	1.0826309	3.6389647
TSHR_pT632I_c1895C_T	tag100273	-1.0	1.0730473	-1.0	1.1820229
CDH1_p_c1009_minus_1G_A	amp575	-1.0	8.4864397	-1.0	3.1575222
CDH1_pI374I_c1122C_T	amp576	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
TP53_pR342X_c1024C_T	tag100124	4.6690612	4.5891628	7.055418	5.8290668
TP53_pE336X_c1006G_T	tag100067	5.6720743	10.180836	11.376378	7.7390614
TP53_pQ331X_c991C_T	tag110908	-1.0	4.6277184	3.7990813	6.2249703
TP53_p_c920_minus_1G_A	tag110798	0.52675718	6.7346411	0.14673744	3.4805758
TP53_pR306X_c916C_T	tag100123	1.4044298	0.90023166	0.04221807	3.1412628
TP53_pE298X_c892G_T	tag100066	4.248929	3.1944499	4.56564	4.4834361
TP53_pE285K_c853G_A	tag100122	2.9213793	5.4176669	8.3620996	5.0256343
TP53_pR273H_c818G_A	tag100169	-1.0	3.6189995	7.2830973	7.6075969
TP53_pR273C_c817C_T	tag100168	0.43075839	1.7194084	-1.0	0.39012143
TP53_pG266E_c797G_A	tag100544	4.1062474	5.6293912	5.8798137	5.3034511
TP53_p_c782_plus_1G_T	tag110665	1.0355332	4.4994521	4.1817045	3.3880868
TP53_pR249S_c747G_T	amp906	6.1178908	3.5928776	1.5832576	2.8855774
TP53_pR248Q_c743G_A	amp904	2.2423937	3.3688345	2.0112553	1.3139342
TP53_pR248W_c742C_T	amp905	3.2289357	1.9620948	1.3387623	1.3975544
TP53_pG245S_c733G_A	amp894	-1.0	1.6580788	-1.0	0.27384466
TP53_pY236C_c707A_G	tag100959	4.9815731	3.8693662	0.40086558	5.2422695
TP53_p_c672_plus_1G_A	tag100120	3.461297	5.6297154	3.7547016	5.02283
TP53_pY220C_c659A_G	amp913	5.0176845	2.4824092	3.927141	5.9053087
TP53_pR213X_c637C_T	tag101899	0.5808726	2.7105217	2.7651699	0.20738657
TP53_pR196X_c586C_T	tag100272	2.4448245	4.1696272	6.5018291	5.4076343
TP53_pH193R_c578A_G	tag100165	7.4262443	7.9942975	5.1129861	5.8320007

TP53_pH179Q_c537T_G	tag100069	3.1567585	2.7140312	3.0641873	2.5535314
TP53_pH179R_c536A_G	tag100070	3.3642783	2.641923	3.7286625	3.6136689
TP53_pC176F_c527G_T	amp890	2.7410109	3.4028606	3.9720366	1.741888
TP53_pR175H_c524G_A	amp901	4.0594683	4.3765812	2.4448669	5.2955904
TP53_pY163C_c488A_G	tag100076	3.6559293	1.3636528	4.8111734	5.0878849
TP53_pA159V_c476C_T	amp888	2.8108935	-1.0	-1.0	1.1494712
TP53_pR158H_c473G_A	amp900	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
TP53_pV157F_c469G_T	tag100075	2.0949857	1.5506772	3.0953913	0.48994318
TP53_pC135F_c404G_T	amp889	-1.0	-1.0	10.8249	0.2931025
TP53_pK132Q_c394A_C	tag100166	7.9460382	1.7534473	2.759881	7.9955525
TP53_p_c376_minus_1G_A	tag100164	0.91955572	0.21919431	6.4496436	0.30897111
TP53_pC124R_c370T_C	tag110632	-1.0	6.043571	-1.0	2.9957459
TP53_pF113C_c338T_G	tag110809	1.7987372	6.699975	4.6381278	0.5478251
MAP2K4_pR154W_c460C_T	tag110983	1.8923535	5.7195621	-1.0	3.1675777
MAP2K4_ps184L_c551C_T	tag111040	1.088306	2.2286518	-1.0	-1.0
MAP2K4_pS280X_c839C_A	tag110782	6.2180924	4.4494405	0.73040265	1.3716114
NF1_pR304X_c910C_T	tag110883	6.2241426	4.324451	4.7192526	2.6835914
NF1_pR461X_c1381C_T	tag110730	4.6196046	11.901588	5.3255477	12.023381
NF1_pR816X_c2446C_T	tag110724	4.7334743	19.152634	9.8961411	9.8484945
NF1_pR1276X_c3826C_T	tag110686	4.3620949	16.298796	1.0498688	8.4294605
NF1_pR1362X_c4084C_T	tag110848	2.523139	1.1436357	6.0622554	0.75196725
NF1_pK1444E_c4330A_G	tag110708	5.2260284	19.305214	-1.0	7.3749599
NF1_pR1769X_c5305C_T	tag110802	2.0901594	2.4656746	1.661424	1.8950512
NF1_pR1968X_c5902C_T	tag110944	3.9952362	3.9690356	0.62144852	0.22627632
ERBB2_pL755S_c2264T_C	tag100249	4.7418022	4.1815057	6.1185303	5.156971
ERBB2_pG776S_c2326G_A	amp644	9.8563499	12.453215	6.2932916	5.0125136
ERBB2_pV777L_c2329G_T	amp646	5.7334862	3.7481174	-1.0	0.92754215
BRCA1_p_c5278_minus_1G_T	tag110749	2.3284802	3.4192643	2.9823449	4.0983052
BRCA1_pR1751X_c5251C_T	tag110751	4.0067396	4.8707967	7.2206306	-1.0
BRCA1_pE1725X_c5173G_T	tag110931	3.59233	4.2243147	2.7636936	-1.0
BRCA1_pS1140G_c3418A_G	tag110783	2.7284782	1.642206	1.4368649	1.9537317
BRCA1_pG1077W_c3229G_T	tag110900	13.528924	13.283318	-1.0	0.85309803
BRCA1_pS1009X_c3026C_A	tag110588	2.1375146	1.859238	2.1734502	3.2509398
BRCA1_pG778C_c2332G_T	tag110932	2.7396312	6.2776871	1.8023182	7.3353281
BRCA1_pH448H_c1344C_T	tag111031	3.8127255	2.0896764	6.279201	6.4503789
BRCA1_pW372X_c1116G_A	tag110958	1.1250594	4.0261655	0.89551419	7.141212
BRCA1_p_c134_plus_1G_T	tag110984	4.8654151	5.6473522	5.4430938	6.6511965
BRCA1_pL30F_c90G_T	tag110753	-1.0	3.6466784	4.8444657	0.10390439
SMAD4_pQ245X_c733C_T	amp870	1.1041347	1.2209883	-1.0	2.4110897
SMAD4_pE330A_c989A_C	tag110884	1.3881317	2.4589133	6.6184711	3.3447163
SMAD4_pY353C_c1058A_G	tag110850	1.9059845	1.7593825	1.3798389	1.1205254
SMAD4_pG358X_c1072G_T	tag110804	0.080659717	5.3876657	3.7683775	3.3504064
SMAD4_pR361H_c1082G_A	tag110852	3.5984054	3.0999043	3.4342017	3.1201849
SMAD4_pR445X_c1333C_T	amp871	4.4232526	1.8999903	3.727443	-1.0
SMAD4_pR497H_c1490G_A	tag110853	2.4550812	1.3724117	0.30851042	1.4432389
SMAD4_pG168X_c502G_T	tag110849	-1.0	3.2225525	3.2200499	6.7039127
SMAD4_pK507Q_c1519A_C	tag110805	6.6855659	6.5328431	1.0676578	0.47039035
SMAD4_pD537Y_c1609G_T	tag110762	4.1211457	16.210037	10.707551	6.487329
STK11_pQ37X_c109C_T	amp885	0.37943235	-1.0	8.4306345	0.10799982
STK11_pQ170X_c508C_T	amp884	0.69212902	-1.0	6.8543348	-1.0
STK11_pD194Y_c580G_T	amp882	-1.0	1.7370569	7.9935069	1.4104029
STK11_pP281L_c842C_T	tag100064	0.69333029	1.8636842	0.13290907	1.5123866
PAK7_pT397K_c1190C_A	tag110707	6.3739386	18.516918	11.537224	3.6564898

SRC_pQ531X_c1591C_T	amp881	0.35372543	-1.0	8.2788544	-1.0
RUNX1_pR204Q_c611G_A	tag100213	6.4197454	5.0778594	2.1118488	4.1316586
RUNX1_pD198G_c593A_G	tag100211	0.089172021	2.0434077	1.8225203	1.9695089
RUNX1_pD198N_c592G_A	tag100212	2.9245429	5.3798356	5.1181078	4.4657698
RUNX1_pR166X_c496C_T	amp868	7.9719615	15.118157	8.1100492	4.3597007
RUNX1_pI114I_c342C_A	tag100159	1.7635694	1.4945331	3.8001251	2.1603661
RUNX1_pR107C_c319C_T	tag100057	2.5901344	5.8913918	-1.0	6.1711473
SMARCB1_pR40X_c118C_T	tag101397	0.40120849	-1.0	0.6196627	-1.0
SMARCB1_pY47X_c141C_A	tag100271	3.0957036	9.6250029	8.8381319	7.9949389
SMARCB1_pR158X_c472C_T	amp874	3.8784666	3.9466274	2.5790396	2.0485017
SMARCB1_pR201X_c601C_T	amp875	2.7376583	9.3502445	3.534363	-1.0
SMARCB1_pE216X_c646G_T	amp873	5.7125163	-1.0	4.9056149	4.903441
SMARCB1_pS299S_c897G_A	amp878	0.21383396	-1.0	4.5124397	3.8173571
SMARCB1_p_c1119_minus_41G_A	amp872	2.0166063	1.3157719	3.7062922	2.9616647
SMARCB1_pR377H_c1130G_A	amp876	-1.0	-1.0	1.7946529	-1.0
NF2_pR57X_c169C_T	tag100207	3.2184899	1.9729131	3.4280086	3.2246654
NF2_p_c240_plus_2T_C	amp732	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
NF2_p_c516_plus_1G_A	amp733	-1.0	3.4993668	4.8284397	2.6528695
NF2_pR196X_c586C_T	tag100049	6.3220868	8.4295807	6.8795328	9.126462
NF2_pR198X_c592C_T	tag100050	1.7611485	6.5890408	4.5821958	6.7348537
NF2_pQ212X_c634C_T	tag100951	4.6801887	3.7732131	-1.0	0.41143984
NF2_pV219M_c655G_A	amp748	2.1276748	3.3374593	-1.0	4.3777266
NF2_p_c675_plus_1G_T	tag100530	2.0182121	6.2355156	-1.0	8.0672474
NF2_pR262X_c784C_T	tag101378	4.6961761	3.5791886	-1.0	-1.0
NF2_p_c810_plus_2T_C	tag100206	2.9891243	1.9151031	4.2593565	4.00314
NF2_pQ337X_c1009C_T	amp737	0.55827647	-1.0	1.6816338	0.86957073
NF2_pR341X_c1021C_T	tag100112	0.68054056	1.3968507	-1.0	2.2511213
NF2_pQ362X_c1084C_T	amp738	4.3059773	16.361784	1.3317742	10.327072
NF2_pQ400X_c1198C_T	tag100110	2.2838862	1.9341257	3.291693	4.5615616
NF2_pQ410X_c1228C_T	tag100111	2.7258012	3.2781615	2.4012265	3.4061589
NF2_p_c1340_plus_1G_A	amp731	1.8504249	4.1237454	4.0757775	1.8108997
NF2_pQ456X_c1366C_T	tag100048	6.5683146	9.7045498	6.6770101	10.950913
NF2_pR466X_c1396C_T	tag100113	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
GATA1_pQ17X_c49C_T	amp675	3.6640022	1.7551972	2.889276	3.1586518
GATA1_pV74I_c220G_A	tag100255	3.4568496	6.3149214	6.2690678	6.4402103
AR_pA749A_c2247C_T	tag110633	0.81764984	1.4689652	3.2613044	1.6614983
IRAK1_pS690G_c2068A_G	tag110610	11.274024	13.589069	-1.0	-1.0

## **Supplementary Word 1**

### ***NOTCH1* mutation analysis**

*NOTCH1* mutation analysis was performed by direct sequencing of reverse transcription (RT)–PCR–amplified *NOTCH1* transcripts. Tumor samples were analyzed by direct sequencing of PCR products expanding *NOTCH1* exons encompassing the sequences encoding the HD domains.

Primer sequences were as follows:

exon FW: GACCAGTACTGCAAGCACCA

exon RV: CAGGAAGTGGAAAGGAGCTGT

Sonde *NOTCH1* 12772 c.4724T>C p.L1575P