



HAL
open science

Criblage de mutations par courbe de fusion en haute résolution (HRM) – Application en Oncologie: précision et performance de la technique par comparaison avec les méthodes classiques de séquençage en vue de son accréditation COFRAC

Sophie Gilles-Manz

► To cite this version:

Sophie Gilles-Manz. Criblage de mutations par courbe de fusion en haute résolution (HRM) – Application en Oncologie: précision et performance de la technique par comparaison avec les méthodes classiques de séquençage en vue de son accréditation COFRAC. Ingénierie biomédicale. 2012. hal-01466472

HAL Id: hal-01466472

<https://ephe.hal.science/hal-01466472>

Submitted on 13 Feb 2017

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

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

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté
par Sophie GILLES - MANZ

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE :

Criblage de mutations par courbe de fusion en haute résolution (HRM) – Application en Oncologie : précision et performance de la technique par comparaison avec les méthodes classiques de séquençage en vue de son accréditation COFRAC.

Soutenu le vendredi 21 décembre 2012 devant le jury suivant :

Mme Christelle LABLEIZ – Présidente
Mr Alex HARLE - Rapporteur
Mr Pierre-Jean LAMY – Examineur
Mme Nadège DUSSAULT – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Pr Pierre-Marie MARTIN

Laboratoire de :

Transfert d'Oncologie Biologique

Directeur :

Pr L'Houcine OUAFIK

Et de

Pr Jean-François JEANNIN.

Laboratoire de :

D'Immunologie et Immunothérapie des cancers
EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

Directeur :

Pr Jean-François JEANNIN

TABLES DES MATIÈRES

I. <u>Introduction au travail</u>	6
A. <u>Généralités – prise en charge actuelle des cancers :</u>	6
B. <u>Epidémiologie</u>	7
C. <u>Initiation et développement des tumeurs solides</u>	8
1. <u>Cancérogenèse</u>	9
a) <u>Phase préclinique : état précancéreux et notion biologique de "haut risque"</u>	9
b) <u>Phase infraclinique</u>	10
2. <u>Tumorigenèse</u>	13
a) <u>Progression</u>	13
a) <u>TEM</u>	14
3. <u>Phase clinique</u>	14
D. <u>Cibles moléculaires en Oncologie Biologique</u>	15
1. <u>Fonctions des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs</u>	15
2. <u>Caractérisation des cellules tumorales / Synthèse</u>	16
3. <u>Cancer du poumon :</u>	17
4. <u>Cancers colorectaux :</u>	18
5. <u>Thérapies ciblées :</u>	18
6. <u>Voie du REGF</u>	19
a) <u>Rappels fondamentaux sur le REGF – Inhibiteurs 1ère génération :</u>	19
b) <u>Résistance aux traitements – Inhibiteurs de 2nde génération :</u>	20
7. <u>La voie RAS/RAF/MEK/ERK</u>	21
II. <u>Validation de la chaîne analytique de criblage HRM et séquençage</u>	22
A. <u>But et projet de l'étude :</u>	22
B. <u>Principe et intérêt de la technique de criblage</u>	23
C. <u>La chaîne analytique dans son ensemble</u>	24
D. <u>Définition des critères de performance pour la validation d'une méthode</u>	

<u>qualitative :</u>	26
1. <u>Spécificité analytique :</u>	26
2. <u>Sensibilité diagnostique :</u>	26
3. <u>Domaine analytique :</u>	26
4. <u>Contamination entre échantillons :</u>	27
5. <u>Robustesse</u>	27
a) <u>La répétabilité</u>	27
b) <u>La reproductibilité</u>	28
6. <u>Stabilité des réactifs (si nécessaire) :</u>	28
7. <u>Comparaison avec une méthode de référence :</u>	28
a) <u>Corrélation avec le séquençage</u>	28
b) <u>Comparaison avec d'autres méthodes</u>	29
c) <u>Concordance avec les résultats nationaux:</u>	30
8. <u>Validation de la méthode par publication dans des journaux scientifiques internationaux</u>	31
9. <u>Justesse</u>	31
a) <u>CQE :</u>	31
b) <u>Comparaisons interlaboratoires :</u>	31
III. <u>Bibliographie</u>	32

ABRÉVIATIONS

AA : Acide aminé
AANE : Acides aminés non essentiels
ADN : Acide désoxyribonucléique
AMM : Autorisation de mise sur le marché.
ATCC : American Type Culture Collection
ATU : Autorisation temporaire d'utilisation
BM : Biologie moléculaire
CBNPC : Cancers bronchiques non à petites cellules
CCR : Cancer colorectal
CGH : Hybridation génomique comparative
CQI : Contrôle de qualité interne
DMSZ : Collection Allemande de Microorganisme et de Culture cellulaire (Deutch Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultren GmbH)
EAQ : European Quality Assurance
EEQ : Evaluation Externe de la Qualité
EGF : Facteur de croissance épidermique
EMQN : European Molecular Genetics Quality Network
FBS : Sérum de Veau Fœtal.
FDA : Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux
FISH : Hybridation in situ en fluorescence
GIST : Tumeur stromale gastro-intestinale
HER : Récepteur pour les facteurs de croissance épidermiques humains
HRM : Fusion haute résolution (High resolution melting curve)
INCa : Institut national du cancer
InVS : Institut de veille sanitaire
LC480 : Light Cycler 480®
LTOB : Laboratoire de Transfert d'Oncologie Biologique
MAPK : Mitogen activated protein kinase
MNC : Mutation Non Codante
OMS : Organisation mondiale de la santé
ORL : Oto-rhino-laryngologie
PCR : Réaction en chaîne par polymérase
PDGFR : Récepteur pour les facteurs de croissance dérivés des plaquettes
PI3KCA : Phosphatidylinositol 3 kinase catalytique alpha
QPCR : PCR quantitative
REGF : Récepteur pour les facteurs de croissance épidermiques humains
RNase : Ribonucléase
SNP : Polymorphisme pour un nucléotide (Single Nucleotide Polymorphism)
STIC : Soutien aux techniques innovantes et coûteuses
TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF : Facteur de développement cellulaire
TK : Tyrosine kinase
TKI : Inhibiteurs de la tyrosine kinase
TNF : Facteur de nécrose tumorale
TNM : Classification des cancers (T : tumeur primitive, N : ganglion, M : métastase)
VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
WT : Type sauvage (Wild Type)

**Criblage de mutations par courbe de fusion en haute résolution (HRM) –
Application en Oncologie : précision et performance de la technique par
comparaison avec les méthodes classiques de séquençage EN VUE DE SON
ACCREDITATION COFRAC.**

GILLES - MANZ Sophie

Le vendredi 21 décembre 2012

RÉSUMÉ

La fréquence et l'agressivité des cancers du poumon et des cancers colorectaux (CCR) dévoilent actuellement un vrai problème de santé publique. Les thérapeutiques traditionnelles, chimiothérapie et radiothérapie, sont peu efficaces voire inefficaces (surtout pour le cancer du poumon), ce qui a nécessité la recherche de nouvelles thérapeutiques. La découverte d'altérations génétiques dans cette population résistante aux traitements traditionnelles a permis de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques : les thérapies ciblées et d'identifier de nouvelles cibles potentielles. Les traitements par thérapies ciblées requièrent la connaissance des modifications génétiques des fonctions protéiques et enzymatiques des cibles (REGF...) et des protéines en aval (KRAS, BRAF...). Ces mutations sont des indications ou des limites aux thérapies ciblées. Leur recherche est devenue une nécessité (exigence des AMM), engendrant une demande de mise au point de techniques performantes, rapides et peu coûteuses de la part des cliniciens.

Pour répondre à cette demande, j'ai mis au point une technique de PCR HRM (PCR de fusion haute résolution) sur les gènes REGF (exons 18 à 21), KRAS (exon 2) et BRAF (exon 15) pour les cancers du poumon et les CCR. La méthode PCR HRM a été validée par comparaison avec la méthode standard du séquençage Sanger sur une population d'environ 250 échantillons par gène, permettant de mettre en évidence une haute spécificité et une bonne sensibilité de la méthode et de l'utiliser comme méthode de criblage. Le criblage consiste à séquencer, après la PCR HRM, uniquement les prélèvements ayant un profil anormal ou douteux et de valider les profils normaux comme non mutés. Cette méthode permet un double contrôle pour les profils anormaux et la détection de mutations connues et non répertoriées, potentiellement activatrices ou inhibitrices du traitement.

Cette mise au point nous a permis de participer à des essais comparatifs nationaux, dans le cadre de contrôles de qualité ou de STIC (Soutien aux techniques innovantes et coûteuses) et d'obtenir une accréditation COFRAC.

MOTS-CLÉS :

Cancer, mutations, HRM, KRAS, REGF, BRAF, poumon, colon.

Pour mieux situer mon travail, et avant d'aborder l'explication du choix technique (§ Validation de la chaîne analytique du criblage HRM), j'ai fait dans l'introduction au travail une synthèse des problématiques du cancer pour expliquer le choix des cancers et le rôle des gènes étudiés.

I. Introduction au travail

Le cancer est un problème de santé publique : Plan cancer 2009-2013 initié par le gouvernement français (cf. § *Epidémiologie*). Ce plan vise entre autres à assurer le transfert rapide des avancées de la recherche au bénéfice de tous les malades, en favorisant les efforts de recherche et d'innovation. Mon travail sur le criblage de mutations entre dans cette démarche de transfert de données fondamentales au service d'expertise clinique humaine, et ce dans une démarche de qualité, notre laboratoire étant accrédité COFRAC (N° agrément 8-1739) entre autre pour les analyses de biologie moléculaire.

Les recherches fondamentales ont permis de mieux comprendre les mécanismes de genèse des cancers. L'oncogenèse implique l'acquisition de nouvelles caractéristiques conduisant la cellule normale vers une cellule cancéreuse ainsi que la modification de son microenvironnement nécessaire au développement tumoral (cf. § *Oncogenèse et Tumorigenèse*). Ces caractéristiques peuvent être, entre autres, la conséquence de modifications au niveau des gènes (cf. § *Fonctions des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs*). Toutes ces caractéristiques tumorales particulières à la cellule tumorale sont des axes de recherche de traitement ciblé (cf. § *Thérapies ciblées*). Certaines approches thérapeutiques innovantes s'orientent particulièrement sur le caractère prolifératif de la cellule tumorale avec la voie du REGF (cf. § *Voie du REGF*) et sur sa capacité à contourner cette voie par une autre : la voie des Map-kinases (cf. § *Voie des RAS/RAF/MEK/ERK*) entraînant un échappement thérapeutique.

Ce travail porte sur les cancers de tumeurs solides non hématologiques de l'adulte et plus particulièrement sur le cancer du poumon et sur le cancer colorectal (CCR) des formes localement avancées ou métastatiques (cf. § *Cancer du poumon* et § *Cancers colorectaux*).

A. Généralités – prise en charge actuelle des cancers :

Il n'existe pas de définition simple du mot cancer. Le cancer correspond à la prolifération anarchique de certaines cellules de l'organisme. Ces cellules qui échappent aux mécanismes normaux de différenciation et de régulation de fonctions et de l'homéostasie tissulaire et cellulaire deviennent capables de déstructurer leur environnement et d'envahir, sur un plan locorégional, le tissu normal avoisinant et de migrer à distance pour former des métastases. A terme, l'évolution des cancers entraîne la mort.

Les maladies cancéreuses sont détectées et caractérisées par des outils :

- Cliniques (observations) : des signes généraux : asthénie, amaigrissement, anorexie ; des signes inflammatoires ; un syndrome tumoral : lié à la présence d'une masse anormale dans l'organisme.
- Imagerie : radiologie (mammographie...), échographie, IRM, scanner, célioscopie, scintigraphie, Tep-scan.
- paracliniques (sur biopsie et pièce opératoire) :
 - 1) *Classiques d'anatomo-pathologie* :

Classification TNM : système international http://fr.wikipedia.org/wiki/Classification_TNM_-_cite_note-0, pour classer les cancers selon leur extension anatomique. Les trois lettres symbolisent la propagation de la maladie cancéreuse

sur le site de la tumeur primitive (T), dans les ganglions lymphatiques voisins (N pour node en anglais) et à distance pour d'éventuelles métastases (M).

Classification internationale des Maladies pour l'Oncologie (CIM-O) publiée par l'Organisation mondiale de la Santé, utilisée par les anatomopathologistes, elle contient une nomenclature codée de la morphologie des tumeurs, visualisée par microscopie optique (cytologie, architecture du tissu tumoral, caractères du stroma).

1) *Actuels* : de biologie cellulaire, de biologie moléculaire.

L'intérêt de ces outils est de permettre de détecter plus précocement l'existence de certains cancers, donc d'en améliorer le typage ainsi que le pronostic et de permettre un meilleur ajustement thérapeutique, et par conséquent d'en diminuer la mortalité.

B.Epidémiologie

Le cancer constitue de plus en plus, dans les pays dits développés, un problème majeur de santé publique, marqué par une augmentation continue des taux de mortalité et d'incidence au cours des dernières décennies, alors que la mortalité liée, par exemple, aux maladies cardio-vasculaires, est en diminution sensible.

Aujourd'hui en France, 1 homme sur 2 et 1 femme sur 3 ont un diagnostic de cancer et 1 homme sur 3 et 1 femme sur 5 meurent d'un cancer.

Le taux de mortalité par cancer en France (standardisé monde) varie notablement selon les localisations cancéreuses.

Les cancers présentant les taux de mortalité (standardisé monde) les plus élevés (supérieur à 6 pour 100 000 personnes-années) sur la période 2003-2007 sont :

- Chez l'homme : le cancer du poumon, le CCR (cancer colon-rectum), le cancer de la prostate, les cancers de l'ensemble ORL (noté « lèvres-cavité buccale-pharynx »), et le cancer de l'œsophage. Ces 5 localisations représentent 52% des décès masculins par cancer.

- Chez la femme : le cancer du sein, le cancer du poumon et le CCR. Ces 3 localisations représentent 42 % des décès féminins par cancer.

5 cancers sont supérieurs à 15 000 nouveau cas par an en France : sein, prostate, colon/rectum et poumon (cf. figure 4) et sont de fait un réel problème de santé public.

Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer, suivi par le cancer du colon, des voies aérodigestives supérieures (ORL), du sein et de la prostate.

La mortalité à 5 ans (environ 90 %) et l'incidence (30 000 cas) sont très élevés pour le cancer du poumon, pour les CCR l'incidence est plus élevée (37 000 cas), et la mortalité à 5 ans plus faible que pour le cancer du poumon mais relativement élevé à presque 50 %

Chez l'homme, l'incidence des cancers du poumon et du CCR est stable et la mortalité en baisse dans les 10 dernières années (3).

Chez la femme, Le CCR a, comme chez l'homme, une incidence stable et une mortalité en baisse, mais pour le cancer du poumon l'incidence et la mortalité sont en nette hausse, dans les dix dernières années (3). Ces évolutions contrastées de la mortalité masculine et féminine par cancer du poumon reflètent pour une grande part, l'entrée plus récente des femmes dans le tabagisme (à la fin des années 60) et le déclin important du tabagisme chez l'homme qui a fait baisser l'incidence du cancer

masculin du poumon en France depuis 2000 (INCa, 2010).

L'agressivité de ces cancers et leur forte incidence posent 3 problèmes :

- de prévention
- de dépistage précoce
- de prise en charge thérapeutique optimisée.

Selon l'OMS les principaux facteurs de risques de cancers (cibles de la prévention) sont :

- Le tabagisme,
- La surcharge pondérale ou l'obésité,
- La consommation insuffisante de fruit et de légumes, et la forte consommation de viande rouge, graisse saturée,
- Le manque d'exercice physique,
- La consommation d'alcool,
- La pollution de l'air des villes,
- Les fumées à l'intérieur des habitations dues à l'utilisation de combustibles solides par les ménages,
- Perte du rythme biologique (travail de nuit..),
- Perturbateurs endocriniens (pesticides, polluants plastiques (bisphénol A)...))
- L'infection à HPV (virus du papillome humain) sexuellement transmissible (cancer du col de l'utérus) et à HBV (virus de l'hépatite C humaine) ; pour les pays en voie de développement ces virus sont un foyer majeur ainsi que le virus d'Epstein-Barr (EBV) (lymphome de Burkitt, cancer du foie).

La hausse actuelle de la mortalité chez les femmes de 48 et 59 ans est liée à l'accroissement de la consommation tabagique au cours des 30 à 50 dernières années.

La meilleure prévention pour le cancer du poumon est la diminution du tabagisme. L'arrêt du tabac, même après des décennies de tabagisme, réduit considérablement le risque de développer ou de décéder d'un cancer du poumon, ce qui montre bien l'impact du tabac sur les cancers du poumon.

La plupart des facteurs de risque sont liés aux habitudes de consommation des pays dits développés, et le CCR est un bon exemple de l'influence du mode de vie sur l'incidence de ce cancer dans un pays. Dans les pays développés, l'incidence est très importante (>20 pour 100 000 en 2008), par rapport aux pays en voie de développement lié à la surcharge pondérale ou obésité et à la consommation de viande rouge entre autres.

Bien que les outils que l'on se demande de mettre en place, soient aussi applicables à la dermatologie (mélanome) et la neurologie (gliome), mon travail va logiquement porter sur les cancers du poumon et du CCR pour améliorer leur prise en charge thérapeutique.

C.Initiation et développement des tumeurs solides

Dans le développement des tumeurs malignes solides, nous retrouvons 3 phases décrites sur le plan clinique :

- préclinique,
- infraclinique,
- clinique.

1. Cancérogenèse

a) Phase préclinique : état précancéreux et notion biologique de "haut risque"

C'est l'étape d'initiation, de dérégulation génomique liée notamment à des mutations ponctuelles, délétions, réarrangements de zones génomiques fonctionnelles. Les altérations non réparées, apparaissant successivement, se potentialisent et se traduisent à terme par une dérégulation cellulaire majeure : la transformation cancéreuse.

Certaines des altérations peuvent se transmettre héréditairement, réduisant de ce fait le nombre de remaniements nécessaires à la transformation cellulaire, traduisant la notion de haut risque ou d'état précancéreux.

La notion d'état précancéreux provient d'observations anatomie-cliniques qui regroupent un ensemble de pathologies à la frontière de la pathologie bénigne dont le diagnostic est associé à une plus grande fréquence de processus cancéreux secondaire dans le tissu atteint, ce qui justifie une attitude clinique de surveillance accrue (phénomène d'initiation et d'inflammation chronique).

La notion de "haut risque" se caractérise comme une plus grande probabilité de survenue d'un cancer sur un terrain favorisé ou partiellement préparé (ex. tabagisme, polymorphisme des gènes de réparation de l'ADN). Le haut risque se traduit par des remaniements génomiques précis, entre autres perte d'allèles, modification de la cartographie chromosomique transmise héréditairement ou acquise individuellement. Les prédispositions génétiques à l'apparition de tumeurs sont dues à une augmentation de la vitesse d'acquisition des mutations.

Il existe trois grands groupes de haut risque qui ne sont pas totalement indépendants les uns des autres.

(1) Haut risque génétique ou familial : existence d'une mutation héréditairement transmissible sur 1 allèle avec perte de fonction.

Il s'agit d'une mutation d'inactivation, transmissible, touchant essentiellement les gènes suppresseurs (anti-oncogènes) : BRCA1 (gène réparateur), BRCA2, BRCA3, p53 (gène régulateur)...

Au cours du développement tumoral chez les sujets non prédisposés, ces mutations apparaissent habituellement dans les cellules transformées. Ces mutations ne représentent qu'une étape particulière dans un phénomène multifactoriel.

(2) Haut risque métabolique ou individuel :

Ceci regroupe deux types d'anomalies :

Déficits dans les systèmes de maintien de l'intégrité du génome :

Il s'agit de mutations du système de réparation de l'ADN provoquées par des carcinogènes chimiques externes ou de l'environnement cellulaire. Certaines pathologies sont héréditairement transmissibles (xéoderma pigmentosum). Pour s'adapter à son environnement, contrôler sa croissance ou se différencier, toute cellule doit réguler l'expression de son information génétique. Parmi les différentes étapes menant d'un gène à son produit, la transcription des gènes est sans doute la plus complexe et la plus contrôlée. Lors de la division cellulaire, la cellule doit également veiller à l'information portée par son génome. En effet, l'ADN subit constamment des modifications par l'action de facteurs soit endogènes (radicaux libres issus du métabolisme cellulaire et instabilité chimique des bases nucléiques),

soit exogènes (rayonnements physiques-UV, carcinogènes chimiques) qui imposent à la cellule de développer des mécanismes de détection et de réparation qui doivent intervenir avant la phase de réplication de l'ADN pour éviter que la lésion ne soit perpétuée sous forme de mutation. Ainsi, le cycle cellulaire doit être provisoirement arrêté de façon à permettre de réparer l'ADN lésé, toute interférence ou tout blocage des systèmes de réparation ou d'apoptose induite en cas de non-réparation sont des facteurs importants de l'instabilité génomique accompagnant le développement tumoral.

Polymorphisme génétique des métabolismes de type I et II

Dans l'environnement, la majorité des pro-carcinogènes sont des molécules hydrophobes qui nécessitent une étape d'activation pour être converties en carcinogènes vrais. Ce métabolisme d'activation est dit de type I. L'élimination de carcinogènes activés passe par leur transformation secondaire en espèces hydrophiles, permettant ainsi à la cellule de les éliminer. Ce métabolisme de détoxification est dit de type II. Ces processus font intervenir différents systèmes enzymatiques :

- le type I : essentiellement famille des cytochromes p450 intervenant dans l'activation de procarcinogènes latents en carcinogènes vrais,
- le type II : N-acétyl-transférase, glutathion-S-tranférése intervenant dans l'inactivation de carcinogènes actifs intracellulaires et leur élimination.

L'étude du polymorphisme génétique liée à la notion de "haut risque" individuel se traduit par une augmentation de l'activité du métabolisme de type I (isoformes des cytochromes p450) et d'une inactivation des enzymes du métabolisme de type II d'élimination, entraînant de ce fait une accumulation intracellulaire de molécules activées pouvant interagir avec l'ADN.

Si ce polymorphisme d'expression de ces voies métaboliques I et II est associé à une dysfonction des mécanismes intervenant dans le maintien de l'intégrité du génome, le haut risque individuel métabolique peut être majeur et entraîner une accumulation rapide de mutations liées au développement tumoral et à la variabilité d'expression des différents types tumoraux.

(3) Haut risque tissulaire et cellulaire : phase S, période de haute sensibilité aux carcinogènes

La stimulation mitotique est la conséquence de stimulations physiologiques ou de dysrégulations spécifiques telles que les pathologies inflammatoires ou dysrégulations hormonales. Cette stimulation mitotique peut favoriser l'accumulation de lésions de l'ADN. En effet, durant le cycle cellulaire, la réplication de l'ADN est la période de très haute fragilité. Si la prolifération se fait dans un contexte de haut risque familial ou de haut risque métabolique individuel, toutes les lésions non réparées peuvent devenir des mutations transmises aux générations cellulaires successives.

b) Phase infraclinique

La présence d'un terrain prédisposant ou « haut risque » est à prendre en compte lors d'une exposition possible aux agents mitogènes et de promotion rencontrés entre autre dans la vie professionnelle. Ces différentes prédispositions liées au « haut risque » rendent plus rapide le franchissement des étapes nécessaires au développement tumoral infraclinique, ce qui recouvre en fait les étapes d'initiation et de promotion.

(1) Etape d'initiation

L'étape d'initiation couvre toute la période durant laquelle des mutations ponctuelles

et remaniements génomiques non réparés vont s'accumuler et dont la traduction ultime est la transformation cellulaire en cellule cancéreuse avec :

- perte de l'inhibition de contact ou perte de la spécificité d'ancrage cellule épithéliale-environnement (cellules adjacentes-membranes basales),
- multiplication indéfinie (immortalisation des clones cellulaires), perte de l'induction du phénomène d'apoptose,
- instabilité génomique se traduisant par des phénotypes multiples, conséquence d'un nombre croissant de remaniements-mutations du génome se traduisant par l'activation d'oncogènes ou la perte de fonction de gènes suppresseurs.

Cette étape de remaniements génomiques est la conséquence de l'action conjointe sur le génome cellulaire d'agents carcinogènes (initiateurs) et d'agents co-carcinogènes (promoteurs) agissant soit sur un génome normal, soit sur un génome déjà en partie modifié (notion de "haut risque").

Un carcinogène ou initiateur est un agent :

- Chimique : benzène, dioxine, amiante..., ces procarcinogènes sont transformés en carcinogène par activation métabolique type 1 (enzyme du Cytochrome P450),
- Physique : UV, radiation cosmique et ionisante, rayon X,
- Biologique : virus (EBV, HPV, HBV...), aflatoxine...

Les carcinogènes chimiques se rencontrent principalement dans les pays dit développés, les viraux plutôt dans les pays en voie de développement et les physiques indifféremment.

Il est présent dans l'environnement, provoquant probablement l'émergence de la majorité des cancers humains (tabac, amiante...). Les co-carcinogènes ou promoteurs ne sont pas des mutagènes par eux-mêmes, mais ils imitent les effets des facteurs de croissance, car ils stimulent temporairement la division cellulaire et dérégulent l'expression de gènes spécifiques.

Les conséquences induites par la carcinogenèse chimique, physique ou virale sont une dérégulation de séquences génomiques spécifiques pouvant être :

- un gain de fonction, par activation d'un proto-oncogène en oncogène actif par mutation pouvant porter sur un seul allèle (action dominante),
- ou une perte de fonction, par inhibition d'un gène suppresseur (anti-oncogène), gène inactivé par mutation négative des deux allèles codant pour ce gène, action cellulaire récessive (la 1ère mutation: somatique ou héréditaire et la 2nde : somatique).

Cette perte ou ce gain de fonction se traduit par un maintien de la cellule tumorale dans un cycle actif de prolifération cellulaire, et perte de l'ensemble des mécanismes régulant l'entrée dans le cycle apoptotique.

Les supports moléculaires de cette activation ou perte de fonction de gènes spécifiques peuvent être :

- par mutation : acquisition d'une mutation dominante conférant de nouvelles fonctions biochimiques à la molécule codée par la séquence génomique touchée entrant dans un phénomène de dérégulations de fonctions cellulaires préexistantes.
- par amplification des gènes : c'est le cas de gènes tels que c-myc, c-erb-B2 ou int-2 dans le cancer du sein. Ce phénomène n'est à l'heure actuelle pas expliqué, mais il semblerait que cela soit un phénomène relativement tardif, car sur des modèles in vitro de cultures cellulaires, cette amplification est observable après l'accroissement des passages. Dans certains cas, l'amplification génique est la réponse de la cellule

à l'environnement par un phénomène d'amplification transitoire (chromosomes double minute) observé entre autres dans le cadre de résistance pléiotropique aux drogues pharmacologiques (résistances multi-drogues MDR). Cette amplification transitoire induite par exemple par les anthracyclines, est ré-inductible à chaque contact avec ces cytotoxiques jusqu'à devenir permanente avec incorporation directe de la zone amplifiée dans le génome.

- par dérégulation de l'expression génique : mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN et des modifications des histones (6-8).

- par gain de télomère : les télomères sont des structures nucléoprotéiques qui protègent les extrémités des chromosomes eucaryotes et sont particulièrement vulnérables en raison de la réduction progressive au cours de chaque cycle de réplication de l'ADN. Le raccourcissement progressif des télomères des cellules somatiques entraîne la sénescence et prévient le cancer. Le dysfonctionnement des télomères peut produire des états physiopathologiques opposés de vieillissement dégénératif ou de cancer dicté par l'intégrité des systèmes de contrôles des dommages de l'ADN. Dans les cancers les plus avancés, la télomérase est réactivée et permet de maintenir la longueur des télomères et de réguler directement les voies d'activation du cancer. (9).

- par remaniements chromosomiques : c'est le cas du lymphome de Burkitt, dont l'origine est le virus d'Epstein Barr, avec trois translocations, mais les difficultés liées aux nombreux remaniements observés dans les tumeurs solides ne permettent pas l'extrapolation de l'apport obtenu sur l'étude des pathologies malignes hématologiques

Pour un même gène, plusieurs modes d'activation peuvent être observés selon les différentes tumeurs observées. C'est le cas de c-erb-B2 qui peut être soit activé par mutation soit par amplification.

Des études ont révélé des modèles distinctifs de mutations de l'ADN dans les différents types de tumeurs (voir [http:// cancergenome.nih.gov /](http://cancergenome.nih.gov/)). Dans un avenir proche, le séquençage du génome de toute cellule cancéreuse promet de clarifier la prévalence des mutations aléatoires ostensiblement éparpillées dans le génome humain.

(2) Etapes de promotion

L'étape de promotion, qui fait suite à l'étape d'initiation, permet l'émergence stabilisée de quelques clones cellulaires tumoraux. Cette étape met en jeu un faisceau complexe d'interactions cellulaires dont le support moléculaire est représenté par les cytokines (facteurs de croissance inhibiteurs) et leurs récepteurs cellulaires spécifiques. Au terme de la phase de promotion débute la phase de progression infraclinique avec une première phase de progression lente, puis une phase de croissance exponentielle où l'émergence clinique de la maladie est associée à une masse tumorale.

La promotion est caractérisée par une grande instabilité génomique et une augmentation de la perte d'homéostasie. L'instabilité génomique est due à des mutations de deux types de gènes :

- Les gènes de régulation (gate keeper genes) : ils assurent le contrôle du passage à une étape ultérieure du cycle cellulaire, ce sont des « points de contrôle » du cycle cellulaire. Une perte de fonction de ces gènes permet à la cellule cancéreuse de passer rapidement à la phase ultérieure du cycle cellulaire, donc in fine de proliférer de façon incontrôlée.

- Les gènes de réparation (care taker genes) : ils assurent physiologiquement la réparation des anomalies liées à l'ADN. Leur inactivation entraîne une instabilité

accrue et une accumulation d'anomalies génétiques (mutation, perte d'hétérozygotie, modifications épigénétiques : hypo/hyperméthylation, désacétylation, etc.).

2. Tumorigenèse

a) Progression

La progression peut être l'objet de trois étapes : une progression in situ associée ou non à un phénomène invasif actif avec rupture des membranes basales, une migration de certaines cellules tumorales dans le stroma sous-jacent, une pénétration vasculaire constituant la première étape du phénomène métastatique.

Ces deux étapes, promotion et progression infraclinique, sous-tendent :

- la notion de stimulation spécifique de la prolifération recouvrant les facteurs de croissance et mécanismes de stimulation en boucles autocrines, paracrines, télocrines,
- la notion d'interactions entre cellules tumorales et l'environnement tissulaire, avec l'induction d'une néo-angiogenèse spécifique.

Elles se déroulent en fait en deux phases : après une première phase non permissive où l'environnement maîtrise la prolifération potentielle des cellules tumorales, l'établissement secondaire de conditions permissives à ces mêmes cellules tumorales permet de proliférer et d'enclencher le développement tumoral.

Nos connaissances actuelles précisent l'importance des anomalies génomiques mais démontrent le rôle capital joué par la dysfonction de l'expression génomique dans la régulation de la croissance des cellules épithéliales tumorales soumises par ailleurs à l'action plus ou moins directe d'une grande variété de molécules informatives spécifiques (hormones et facteurs de croissance). Elle dépend également d'une série d'interactions complexes entre les différentes populations cellulaires qui composent l'hétérogénéité tumorale, ainsi qu'entre les cellules épithéliales tumorales et le tissu environnant au sein duquel elles se développent. Des modifications ou des altérations de ces différents types d'interactions peuvent affecter l'évolution tumorale et la réponse des cellules tumorales aux agents thérapeutiques. Le développement de la plupart des tumeurs solides est discontinu, faisant alterner périodes de dormance et croissance plus ou moins rapide. Au stade précoce du développement tumoral, les cellules épithéliales normales environnantes sont capables, via la production de facteurs inhibiteurs, d'établir une contrainte non permissive à la prolifération des cellules tumorales.

Le stroma tissulaire participe également à cette contrainte non permissive par le maintien d'un turn-over constant des membranes basales.

Secondairement, avec une grande variabilité dans le temps, des dysfonctions métaboliques et de signalisation, consécutives au vieillissement cellulaire et tissulaire ainsi qu'à l'amoindrissement de la composante épithéliale normale induite par apoptose, provoquent un déséquilibre entre les taux de sécrétion des facteurs inhibiteurs et stimulateurs. Ce déséquilibre entraîne l'établissement de conditions permissives à la prolifération des cellules pathologiques et au développement tumoral in situ. Dans ce même contexte de déséquilibre, certaines dérégulations cellulaires peuvent faire jouer aux cellules du stroma et de l'endothélium un rôle fondamental dans le développement de la néo-angiogenèse et de l'invasivité tumorale locale, phénomènes indispensables à l'initialisation du processus métastatique.

a) TEM

Les cellules épithéliales bien différenciées possèdent des complexes jonctionnels séparant la membrane cellulaire en domaine apical et baso-latéral. Ils permettent l'adhésion cellule-cellule, et la conservation de l'intégrité tissulaire, ils forment une unité fonctionnelle cohésive et diminuent la motilité cellulaire (10).

Durant leur évolution invasive et métastatique les cellules tumorales diminuent l'expression de leurs marqueurs épithéliaux et perdent leurs jonctions intercellulaires dont la E-Cadhérine. En résulte une perte de la polarité cellulaire, une diminution de l'adhésion intercellulaire et une augmentation de la capacité de motilité de la cellule. Ce phénomène est associé à une augmentation de l'expression des gènes liés à un phénotype mésenchymateux. Il s'agit de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).

La TEM se définit donc par la perte des caractères épithéliaux de la cellule et par l'apparition de caractéristiques spécifiques des cellules mésenchymateuses. Elle permet à la cellule d'acquérir des capacités de migration, d'invasions propices au développement de métastases. Ce mécanisme est identique à celui décrit durant l'embryogénèse (11).

Différents mécanismes sont impliqués dans La TEM. La cellule a besoin de se détacher des autres cellules et d'acquérir des capacités d'invasion (12, 13). Elle perd ses jonctions adhérentes se traduisant par diminution de l'E-cadhérine. Elle perd ses jonctions serrées (diminution des claudines et occludines) ce qui entraîne une perte de sa polarité apico-basale. Elle devient asymétrique ce qui facilite sa motilité. Différentes protéines du cytosquelette sont nécessaires pour la formation du pseudopode lui permettant de migrer. On décrit une augmentation de la γ -actine, β -filamine, taline, vimentine (14). Les filaments intermédiaires de kératine sont down-régulés. L'interaction avec la matrice extracellulaire nécessaire à la migration se fait avec des intégrines. La $\beta 5$ -intégrine est up régulées (14). La cellule transformée est capable de migrer mais pour parfaire sa progression à travers la matrice extracellulaire elle a besoin de digérer ses composés. Elle augmente sa production de métalloprotéinases (MMP). Les MMP-11, 12, 14 sont surexprimés (14). Par l'ensemble de ces mécanismes la cellule passe d'un phénotype épithélial à un phénotype mésenchymateux. La TEM n'est pas un phénomène de tout ou rien. Elle peut être partielle.

Différentes voies sont impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateus. On retrouve la voie des mitogen-activated-protein kinases (MAP kinases) et de la phosphatidylinositol 3-kinase via les récepteurs à tyrosine kinase impliquant SNAIL et SLUG (13). La voie du TGF β joue également un rôle dans ce phénomène en intervenant dans des mécanismes RAS dépendant (MAP kinase) ou SMAD dépendant (ZEB2) (14).

La troisième voie impliquée est celle du NF- κ B via TWIST (15).

3. Phase clinique

Dans la plupart des tumeurs solides humaines, en fin de phase infraclinique, alors que la tumeur primitive amorce une croissance de type exponentielle, on observe alors un processus d'invasion métastatique sur lequel repose en fait le pronostic de la maladie cancéreuse. Les métastases sont le résultat d'une sélection de cellules tumorales présentant le phénotype métastatique suivant deux grandes hypothèses :

- soit l'expression du phénotype métastatique est un événement transitoire apparaissant à certaines étapes de l'envahissement tumoral
- soit le phénotype métastatique est un fait génomique propre à certains clones

cellulaires dont l'apparition au sein du développement tumoral va en faire tout le pronostic.

Au terme de la migration dans le stroma, les cellules invasives métastatiques protéolysent à nouveau les membranes basales vasculaires et pénètrent dans la circulation sanguine capillaire où elles sont confrontés au système complexe de défense immunitaire.

L'évolution des cellules par cancérogenèse et plus particulièrement par la TEM, vers une forme avancée voire métastatique de cancer, correspond à l'état des tumeurs du CCR et du poumon sur lesquelles porte mon travail.

D.Cibles moléculaires en Oncologie Biologique

1. Fonctions des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs

L'étude de rétrovirus capables d'engendrer des tumeurs et la recherche de similitude chez de nombreuses espèces dont l'homme, aux débuts de la biologie moléculaire, ont permis la découverte primordiale des gènes de cancer (oncovirus : c-onc, v-onc) : les oncogènes, puis des anti-oncogènes rebaptisés gènes suppresseurs de tumeurs.

La fonction spécifique que l'on peut relier aux oncogènes et aux gènes suppresseurs fait mieux comprendre leur rôle dans le dysfonctionnement cellulaire. Ainsi il est important de faire un rappel succinct de nos connaissances actuelles dans le domaine des facteurs de croissance et transmission du signal mitogénique.

Les facteurs de croissance : à ce jour, une centaine de facteurs de croissance ont été isolés. Ils semblent regroupés dans un nombre restreint de classes différentes. Le PDGF (platelet derived growth factor), l'EGF (epidermal growth factor), le TGF- α (transforming growth factor type α), l'IGF (insulin like growth factor), et les FGF (fibroblast growth factor) sont impliqués dans la stimulation de la prolifération des tissus, alors qu'un effet inhibiteur a été observé sur certains types cellulaires pour le TGF- β (transforming growth factor type β). La croissance cellulaire normale est la résultante de l'action coopérative de facteurs stimulateurs et inhibiteurs de la prolifération, et en conséquence de leur régulation appropriée (16). Cependant, il est à noter que des facteurs identiques peuvent être, selon les conditions spécifiques tissulaires ou expérimentales, stimulateurs ou inhibiteurs pour un même type cellulaire, ou avoir, au sein d'un même tissu, des effets dissociés selon les phénotypes cellulaires présents.

Les récepteurs transmembranaires : La fixation d'un effecteur sur son récepteur transmembranaire stimule une cascade d'événements intracellulaires liés à la transmission du signal qui peut être médiée par différentes voies. Plusieurs types de récepteurs membranaires ont été décrits (17). Ces récepteurs peuvent être à activité sérine-thréonine kinase, à activité tyrosine kinase (18), et couplés aux protéines G (19).

Transmission du signal mitogénique : il existe plusieurs types de mécanismes ou cascades moléculaires de transmission intracellulaire d'un signal mitogénique extracellulaire dont les étapes ultimes sont les sites nucléaires d'initiation de la transcription ou réplication de l'ADN. Ces cascades mettent en jeu des interactions macromoléculaires successives avec activation par phosphorylation transitoire.

Les récepteurs nucléaires : ces récepteurs sont spécifiques pour des ligands lipophiles pouvant pénétrer directement à travers les membranes cellulaires. Ils forment une famille de facteurs de transcription régulés par la fixation de leurs ligands, et possèdent une organisation structurale commune (20, 21).

Cette super famille inclut les récepteurs des hormones stéroïdes dont le récepteur des œstrogènes, les récepteurs de l'acide rétinoïque, les récepteurs de la vitamine D, ainsi que des récepteurs dont on ne connaît pas le ligand appelés récepteurs "orphelins".

Deux types de fonctions liés aux oncogènes et gènes suppresseurs peuvent être analysés

- les gènes activateurs, ces oncogènes peuvent coder pour :

) des protéines de la classe des facteurs de croissance, tels le PDGF pour sis, le FGF3 pour int-2 et le FGF pour hst,

) des récepteurs aux facteurs de croissance, tels le R-EGF pour c-erb-B1, un analogue du R-EGF pour c-erb-B2,

) des protéines intervenant dans la transmission du signal cellulaire, telles la famille de ras, c Ha ras, c Ki ras (KRAS), N-ras, R-ras, B-ras,

) des protéines intervenant dans la transmission intracellulaire, telle la protéine kinase C qui, mutée, perd son rôle régulateur par stimulation continue (22).

Certains oncogènes codent pour des protéines à localisation nucléaire, et forment ainsi la dernière étape de la transmission du signal intracellulaire. Ils peuvent avoir un rôle soit dans la régulation de la transcription, soit dans la réplication de l'ADN, voire les deux. La protéine myc forme des homodimères ou hétérodimères avec une autre nucléoprotéine Max qui jouerait un rôle de régulation pour certains gènes spécifiques, entre autres p53.

- les gènes suppresseurs : ces anti-oncogènes codent pour des activités cellulaires essentielles dans un contexte physiologique évitant toute dysfonction. Ce sont essentiellement :

) l'arrêt au point G1-S du cycle cellulaire, permettant entre autre la réparation du génome,

) l'induction de la mort cellulaire programmée ou apoptose en cas de non réparation possible du génome lésé ou au terme d'une fonction cellulaire hautement différenciée,

) l'induction de la différenciation cellulaire post-mitotique,

) enfin, certains de ces gènes suppresseurs codent pour une activité phosphorylase permettant le retour à un statut inactivé de macromolécules activées par phosphorylation à des étapes-clés de la fonction cellulaire.

Ainsi parmi les nombreux gènes suppresseurs, Rb est un facteur de transcription, p53 une protéine nucléaire présente à de très faible taux dans des cellules normales et contrôlant le cycle cellulaire G1-S permettant l'évolution vers la réplication (S) ou la bloquant, BRCA1 quant à lui semblerait être un facteur impliqué dans la réparation des lésions radio-induites de l'ADN du fait de son analogie avec la famille rad-45.

2. Caractérisation des cellules tumorales / Synthèse

Voici les propriétés associées à la transformation cellulaire tumorale d'après (23) :

- Autonomie de production en facteurs de croissance,

- Insensibilité aux inhibiteurs de croissance et d'hémostasie (perte d'inhibition de

contact),

- Néangiogenèse activée et prolongée (interactions hétérotypiques épithélium tumoral-stroma),
- Echappement à l'apoptose
- Pouvoir d'invasion tissulaire et migration par voie hématogène/lymphatique (dérégulation des programmes de réparation tissulaire)
- Potentiel de réplication illimité.

De nouvelles voies émergentes sont actuellement explorées sur la cellule tumorale (24) :

- Capacité d'échappement au système de défense immunitaire,
- Dérégulation du métabolisme cellulaire,
- Capacité de détourner l'inflammation comme promoteur tumoral,
- Instabilité génomique et mutabilité.

Ces caractéristiques acquises, des cellules tumorales, sont la cible des nouvelles thérapeutiques moléculaires.

3. Cancer du poumon :

Le cancer bronchique est une tumeur maligne originaire de la muqueuse tapissant les bronches. On parle de cancer primitif du poumon ou plus communément du cancer du poumon.

Histologie

Le cancer du poumon ou cancer bronchique est une maladie due à une croissance cellulaire anarchique dans les tissus du poumon. Cette croissance peut donner des métastases, qui sont l'invasion de tissus adjacents ou l'infiltration en dehors des poumons.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) distingue les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC) et les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) c'est à dire : carcinomes épidermoïdes, adénocarcinomes, carcinomes à grandes cellules, classés selon la taille et l'aspect des cellules malignes examinées au microscope par un anatomopathologiste (25).

- Les CBPC sont des tumeurs neuroendocrines: ils représentent 20% des cancers bronchiques.

- Les CBNPC :

-) Les carcinomes épidermoïdes sont les plus fréquents en Europe : 55% des cancers bronchiques.

-) Les adénocarcinomes sont les cancers glandulaires (plus fréquents aux Etats Unis) : 20% des cancers bronchiques.

-) Les carcinomes à grandes cellules sont de moins en moins diagnostiqués : 5% des cancers bronchiques.

Cette distinction est importante, parce que le traitement en dépend : le carcinome du poumon non à petites cellules est souvent traité par chirurgie, tandis que le carcinome à petites cellules répond mieux généralement à la chimiothérapie et à la radiothérapie

Epidémiologie

Comme nous l'avons vu, le cancer du poumon représente la plus grande cause de mortalité par cancer commun aux hommes et aux femmes ; essentiellement lié au comportement individuel de tabagisme (cf. figure 6 et 7) mais aussi aux maladies

professionnelles (exposition non protégée aux poussières organiques ou minérales et solvants). 80 % d'entre eux sont des CBNPC. Parmi les CBNPC, 50 % sont diagnostiqués au stade métastatique. En dépit des avancées chirurgicales et thérapeutiques, la survie des patients s'est faiblement améliorée ces dernières décennies, avec un taux de guérison à 5 ans inférieur à 15 %.

Traitement

L'existence des mutations du gène du Récepteur de l'Epidermal Growth Factor (REGF) dans le cancer bronchique a été découverte en 2004. Elles sont présentes chez environ 10 % à 15 % des patients avec CBNPC, et 80 % des patients répondent aux traitements REGF-TKI (26). Le REGF, récepteur à protéine tyrosine kinase, intervient dans de nombreux mécanismes du développement tumoral et il est une cible thérapeutique dans de nombreux cancers et plus particulièrement dans cette pathologie. Le Gefitinib (Iressa®) et l'Erlotinib (Tarceva®) sont des inhibiteurs (REGF-TKI) spécifiques de la protéine codée par le gène REGF, en effet elles bloquent, via l'inactivation du domaine tyrosine kinase, la multiplication cellulaire tumorale. L'Erlotinib et le Gefitinib sont utilisés en 1^{ère} ligne pour les CBNPC métastatiques avec des mutations activatrices du REGF (Tarceva® : AMM 11/2005, (27), Iressa® : AMM 06/2009). La présence de points de mutations ou de délétions dans les exons 19 à 21 du REGF, provoque une prolifération tumorale incontrôlée par stimulation de la croissance et intervient dans la balance survie-apoptose. Ces mutations du gène REGF (Del 19, L858R et G719S) sont donc associées à une meilleure réponse au traitement, mais la survie sans progression ne dépasse pas 12 mois (28) et la très grande majorité des patients acquiert une résistance.

Des mécanismes de résistances primaire et secondaire aux REGF-TKI, tels que des mutations de KRAS (29), BRAF, PIK3CA (30, 31), de l'exon 20 du gène REGF (en particulier la mutation T790M) (32), ou encore l'amplification de c-MET (33) ont été décrits.

4. Cancers colorectaux :

Le cancer colorectal (CCR) est une tumeur développée à partir de la muqueuse colique.

Histologie

Il dérive de l'épithélium glandulaire, en débutant par la formation d'adénomes, qui ensuite peuvent évoluer vers une dysplasie de degré croissant, de modérée à sévère, associant des anomalies architecturales de l'épithélium des glandes (stratification, plissement, bourgeonnement), des anomalies cellulaires nucléaires (anisonucléose, hyperchromasie, anomalies des mitoses) et cytoplasmiques (perte de la mucosécrétion), aboutissant à la formation d'un cancer.

La carcinogénèse colique est un phénomène complexe, multifactoriel et progressif, suivant généralement la séquence adénome vers cancer. Le traitement des CCR repose principalement sur la chirurgie.

Epidémiologie

Comme vu précédemment, les cancers colorectaux représentent les cancers les plus fréquents chez les non-fumeurs communs aux deux sexes.

Dans moins d'un cas sur dix, il s'agit de formes familiales liées à une prédisposition génétique.

Environ 40 % des patients atteints de CCR présentent une mutation somatique du gène KRAS et environ 10 % du gène BRAF. Ces mutations sont décrites comme mutuellement exclusives. Ces deux gènes codent pour des protéines faisant partie de la voie des MAP kinases impliquée dans la prolifération cellulaire et déclenchée par l'activation des récepteurs tels que le REGF. Les protéines issues de ces gènes

mutés restent activées en permanence et les traitements par des inhibiteurs du REGF restent inefficaces (comme pour les cancers du poumon).

Traitement

Le Cetuximab® et Panitumumab®, anticorps anti-REGF, montrent une efficacité uniquement chez les patients dont la tumeur porte la forme sauvage du gène KRAS, plusieurs molécules (inhibiteur de BRAF, inhibiteur de MEK...) ciblant les autres altérations moléculaires, sont en phases cliniques chez des patients dont la tumeur porte une mutation de BRAF ou de KRAS. (Programme INCa – Thérapies ciblées 30 Juin 2010)

5. Thérapies ciblées :

Une des premières approches de thérapies ciblées contre le cancer fut l'hormonothérapie, avec la recherche des récepteurs hormonaux dans les tumeurs du sein.

L'émergence des nouvelles thérapies moléculaires ciblées correspond à une modification essentielle dans le développement des agents anti tumoraux car l'agent anticancéreux en question est spécifiquement évalué pour sa capacité d'action sur une cible moléculaire impliquée dans l'oncogenèse. En ce sens, les thérapies moléculaires ciblées découlent de la meilleure connaissance des mécanismes fondamentaux des processus d'oncogenèse qui ont permis d'identifier les altérations clés inhérentes au phénotype tumoral.

Ces médicaments peuvent avoir pour cible des récepteurs membranaires ou une cible intracellulaire. Les inhibiteurs de récepteurs membranaires peuvent être séparés en deux familles selon leur site d'action : ils peuvent être soit des anticorps monoclonaux, humanisés (umab) ou non (mab), qui s'administrent par voie intraveineuse et agissent sur les ligands de récepteurs membranaires ou sur la portion extracellulaire de ces récepteurs, soit des inhibiteurs de tyrosine kinase (inib), qui sont de petites molécules d'administration orale qui agissent sur la portion intracellulaire des récepteurs.

La cible doit être suffisamment spécifique des cellules cancéreuses ou d'un type de cellules cancéreuses pour assurer sa reconnaissance et suffisamment déterminante dans le processus cancéreux pour que l'atteinte de cette cible moléculaire puisse entraîner la destruction de la cellule.

La détection directe, dans le prélèvement tumoral du patient, de ces cibles thérapeutiques ou encore d'une des protéines inhérentes au phénotype tumoral, est devenue une obligation encore limitée à certaines drogues. Pour cette raison s'est posée très tôt la question du caractère prédictif de l'expression des cibles. Le premier exemple du trastuzumab inhibant le récepteur HER2 a démontré qu'une expression importante de la cible était indispensable à la possibilité de réponse au traitement dans le cancer du sein.

Il en a été de même pour l'imatinib dans les GIST où l'existence d'une mutation inactivatrice de KIT est nécessaire à l'activité du composé.

En revanche, le caractère prédictif de la cible REGF a été beaucoup moins net pour les inhibiteurs d'EGFR, mais aujourd'hui certains mécanismes de résistance ont été élucidés. Récemment, les mutations activatrices KRAS ont été identifiées comme facteur de résistance aux inhibiteurs d'EGFR.

Dans le cancer du poumon, nous avons la démonstration qu'une molécule qui bloque l'activité du récepteur EGF (Gefitinib et Erlotinib), uniquement lorsque ce récepteur est muté, a une activité aussi importante que celle de la chimiothérapie (34).

6. Voie du REGF

a) Rappels fondamentaux sur le REGF – Inhibiteurs 1ère génération :

Le récepteur à l'épidermal growth factor (REGF) est l'un des quatre membres de la famille HER des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase (35) : REGF ou HER1, HER2 ou C-erbB2, HER3 et HER4. C'est une protéine d'environ 1200 acides aminés possédant un domaine transmembranaire et une partie extracellulaire glycosylée qui fixe son ligand (figure 12a). Le domaine intracellulaire, caractérisé par une activité tyrosine kinase, est activé lorsque le ligand se fixe à son récepteur (36). Ce récepteur activé catalyse le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP vers la chaîne latérale d'un résidu tyrosine, à la fois sur le récepteur lui-même et sur des protéines cellulaires spécifiques (37, 38). Ainsi, la liaison du ligand sur le REGF provoque la dimérisation du REGF, rendant les deux domaines intracellulaires capables de se phosphoryler mutuellement sur des résidus tyrosine. Il existe des phénomènes d'hétérodimérisation entre le REGF et d'autres membres de la famille HER. Les ligands préférentiels du REGF sont l'EGF et le TGF α . La phosphorylation des résidus tyrosines intracytoplasmiques déclenche des signaux de transduction intracellulaire (figure 13), impliquant en particulier la voie des MAP-kinases, des phosphatidylinositol-3 kinases et de STAT3 (voie AKT) (37). L'activation du REGF induit des modifications de la physiologie cellulaire avec, en particulier, une activation de la survie cellulaire et une inhibition de l'apoptose par les voies d'activation d'AKT (38, 39). Inhiber les voies d'activation du REGF a pour objectif de ralentir la division cellulaire et de restaurer en partie les capacités apoptotiques des cellules tumorales.

Différents mécanismes peuvent être à l'origine de l'hyperactivation de la voie REGF dans les tumeurs : surexpression du récepteur lui-même (en partie seulement liée à l'amplification du gène), surexpression des ligands, mutations activatrices du REGF.

Le récepteur de l'EGFR est exprimé dans de nombreuses tumeurs solides : colorectales, pulmonaires (non à petites cellules), gastriques, ovariennes, ORL. L'indication de la prescription est dépendante de la drogue utilisée et son mode d'action mais aussi de la pathologie. Quoi qu'il en soit les anti REGF possèdent un large spectre d'action qui s'étend avec les récentes découvertes mais sa prescription reste toujours liée à une indication de présence ou d'absence de mutations activatrices ou inhibitrices.

Dans les CBNPC, les mutations du REGF ont été détectées dans les exons 18, 19 et 21 qui codent pour le domaine kinase intracellulaire. Les mutations les plus fréquentes détectées dans l'exon 18 sont la substitution de l'acide aminé (AA) G719 dans la boucle P, celles dans l'exon 21 sont majoritairement la substitution d'AA L858 ou L861 dans le domaine d'activation, celles de l'exon 19 sont des délétions qui altèrent la structure de l'hélice α C.

b) Résistance aux traitements – Inhibiteurs de 2nde génération :

La survenue de mutations des cibles thérapeutiques est un phénomène majeur pour les inhibiteurs de tyrosine kinase. Ces mutations, observées sans doute à la suite d'un processus de sélection, obligent à concevoir de nouveaux inhibiteurs et à utiliser une thérapie ciblée « séquentielle », au fur et à mesure qu'apparaissent les résistances.

Quelquefois la sensibilité des techniques de détection et l'hétérogénéité des prélèvements tumoraux, ne permet pas de mettre en évidence de faibles quantités de cellules tumorales mutées au sein du prélèvement, et le traitement lui-même se charge alors d'éliminer les cellules sensibles en provoquant la prolifération des

clones résistants.

Un autre mécanisme de résistance propre aux thérapies ciblées provient de la plasticité et de la redondance des voies de signalisation sur lesquelles agissent ces composés. Tout mécanisme d'oncogenèse activé ou réactivé en aval de la cible propre du médicament permettra à la cellule cancéreuse d'échapper à son action.

Au diagnostic, la présence d'une mutation T790M est le plus souvent associée à une mutation activatrice de type L858R et constitue un élément de mauvais pronostic sur la survie sans progression sous TKI-EGFR (41). À l'inverse, la sélection d'une mutation T790M au moment de la progression sous TKI-EGFR est associée à un échappement local, progressif et de meilleur pronostic probablement car la maladie reste en partie contrôlée par le TKI. Par ailleurs, l'adjonction d'une chimiothérapie au TKI-EGFR paraît possible et semble permettre l'obtention d'un nouveau contrôle de la maladie. Néanmoins, dans cette situation l'inclusion dans un essai thérapeutique évaluant l'efficacité des nouveaux TKIs irréversibles de l'EGFR (BIBW2992 : afatinib®, PF299804), théoriquement actifs sur les mutants T790M, pourrait être également proposée.

Des inhibiteurs irréversibles d'EGFR de 2ème génération, comme l'afatinib® (BIBW2992) permettraient de passer outre cette résistance secondaire liée à la mutation T790M d'EGFR.

PF299804 est un autre puissant inhibiteur irréversible de la tyrosine kinase des récepteurs épidermiques humains du facteur de croissance (HER) 1 (EGFR), HER2, et HER4 (Pan-HER).

7. La voie RAS/RAF/MEK/ERK

Le cas des mutations de l'oncogène KRAS dans les cancers colorectaux est emblématique, parce que conditionnant de façon quasi absolue la sensibilité aux agents capables de bloquer le REGF, situé en amont de KRAS dans les voies de signalisation qu'il active (Figure 13).

La voie RAS/RAF/MEK/ERK est activée dans environ 20% des cancers connus : sein, prostate, pancréas, poumon, thyroïde, plus de 50 % des leucémies aiguës, et cette activation est associée à un pronostic péjoratif. Par exemple :

- Les gènes RAS sont mutés dans 15% des cancers humains, en particulier NRAS (Q61L) dans 15 à 30% des mélanomes, et KRAS (G12 et G13) dans 35 à 40 % des CCR et 22 % des CBNPC.
- Le gène BRAF dans 66 % des mélanomes (plus précisément V600E), 30 à 50% des cancers de thyroïde, 30% des tumeurs ovariennes et 5 à 20% des cancers colorectaux.

Inhibiteur de BRAF

Depuis 2002, le rôle essentiel de BRAF au cours de l'oncogenèse a été confirmé grâce à la mise en évidence de l'existence de mutations activatrices de ce gène dans un nombre significatif de tumeurs humaines.

Sorafenib (Nevaxar® Bay 43-9006) inhibe spécifiquement BRAF. Il s'agit de la première génération d'inhibiteur de BRAF approuvée par le FDA et utilisée pour le traitement des cancers du rein et les carcinomes hépatocellulaires. Des études de phase combinant sorafenib® et chimiothérapie, ont donné des résultats encourageants pour le traitement des mélanomes, mais, même si les études pré-cliniques montrent une plus grande sensibilité pour le variant V600E, il existe, à ce jour, un traitement approuvé pour les mélanomes métastatiques BRAF muté V600, le vémurafénib (Zelboraf®, AMM 03/2012) commercialisé chez Roche.

Un médicament en cours de validation ayant pour cible les patients présentant une

mutation KRAS est l'AZD6244. Il s'agit de nouvelle génération de thérapies ciblées inhibant sélectivement les kinases MEK. Elle bloque la transduction de signaux de croissance et de prolifération de la voie des RAS MAP kinases.

Il a été observé que, dans les cellules tumorales ayant une mutation activatrice de RAS, les inhibiteurs de MEK ne sont pas d'activité constante, alors qu'ils le sont dans les cellules ayant une mutation activatrice de RAF. De même, les inhibiteurs de mTOR, une kinase d'aval de la voie de la PI3 kinase, n'ont qu'une activité modérée dans les cellules ayant une mutation de RAS. Ces résistances peuvent être expliquées par l'interconnexion des voies de signalisation, l'une pouvant prendre le relais de l'autre lors du blocage thérapeutique de la première. La double inhibition de la voie des MAP kinases par un inhibiteur de MEK et de la voie de la PI3kinase par un inhibiteur de mTOR s'impose donc conceptuellement pour le traitement de ces tumeurs KRAS mutés.

De nombreuses molécules sont en phase d'essai et le devenir de certaines d'entre elles reste encore incertain, par contre il est sûr que leur prescription se fera après détermination des mutations.

II.

Validation de la chaîne analytique de criblage HRM et séquençage

A. But et projet de l'étude :

Nous avons vu que le statut mutationnel somatique des gènes KRAS, BRAF et REGF est indispensable pour l'orientation des nouvelles thérapies ciblées dans certains cancers du colon et du poumon. Actuellement l'INCa subventionne 28 plateformes en France, dont notre laboratoire, pour les CBNPC sur la recherche des mutations des gènes REGF (Exons 18 à 21), KRAS, BRAF, HER2 et PI3KCA (9 PCR) et pour les CCR sur la recherche des mutations des gènes KRAS et BRAF (2 PCR). Par semaine, nous effectuons la recherche de mutations sur environ 50 échantillons. L'obtention d'un résultat fiable dans un délai compatible avec le traitement est notre priorité. Pour cela il nous a fallu mettre au point et valider une méthode permettant un criblage, des mutations, rapide et moins coûteux que le séquençage.

Criblage avant séquençage

La détection de mutations somatiques ne peut être effectuée que dans la tumeur. Indépendamment de l'accès à cette tumeur, l'analyse est gênée par :

- la contamination du tissu tumoral par des cellules normales du stroma (fibroblastes, lymphocytes, cellules endothéliales) dont le génotype est normal ;
- l'hétérogénéité intratumorale avec présence de la mutation dans un sous-clone de cellules uniquement ;
- l'existence de mutations à l'état hémizygote, présentes sur un seul des deux allèles seulement.

Tout cela a pour conséquence la nécessité de techniques de détection de ces mutations somatiques hautement sensibles (43).

A la différence des recherches de polymorphismes, l'analyse de mutations somatiques nécessite soit un balayage complet de la séquence d'un gène, soit de quelques exons, ou dans le meilleur des cas de positions spécifiques (Hotspot). La mise au point de technique de criblage de mutations est d'une importance capitale pour la diminution des coûts et du temps d'analyse.

Méthode de criblage pré-séquençage : (cf. figure 14)

L'utilisation de la technique *PCR-high resolution melting curve* (PCR-HRM) permet, après validation par comparaison avec les résultats obtenus par séquençage d'une série importante d'échantillons, de ne séquencer plus que les prélèvements suspectés mutés.

Cette technique repose sur l'utilisation de molécules de type SYTO9, EvaGreen® ou ResoLight® qui fluorescent à 535nm uniquement lorsqu'elles s'intercalent dans le petit sillon de l'ADN double brin. La mesure de la spécificité de la réaction se fait par analyse de la courbe de fusion (T_m) du produit de PCR quantitative (amplicon): la montée en température d'une solution contenant l'amplicon et la molécule fluorescente provoque la dissociation du double brin d'ADN occasionnant une chute de la fluorescence liée à la « libération » de la molécule fluorescente devenant ainsi indétectable. La température de dénaturation du produit amplifié est caractéristique de sa composition en GC, de l'enchaînement de ses bases, de sa taille et de la composition en sel du milieu réactionnel.

Avec la fusion à haute résolution, des amorces ou des sondes spécifiques ne sont pas nécessaires pour cibler les divers variants (amorces communes entre la PCR-HRM et le séquençage), et ces variants peuvent être détectés indépendamment de

leur position au sein du fragment.

Cette technique ne permet pas de déterminer le type de mutations, mais permet de valider les profils HRM normaux comme non mutés sans que le séquençage soit nécessaire. Par contre, les profils HRM anormaux sont séquencés afin de confirmer la présence d'une mutation et de la typer.

PCR HRM : elle contient 2 périodes : les *cycles de PCR* (dénaturation de l'ADN en simple brin, hybridation des amorces avec l'ADN et synthèse de l'amplicon) avec 4 phases fluorescentes (1- amplicon non détectable, 2- phase exponentielle, 3- phase linéaire et 4- le plateau contenant des amplicons sauvages et/ou mutés) ; le *test de fusion* avec une dénaturation suivi d'une hybridation, pour créer, si présence de mutation, des hétérodimères (allèle sauvage hybridé avec allèle muté), et des homodimères (2 brins sauvages et/ou 2 brins mutés), suivi d'une augmentation progressive de la température permettant la dissociation des hétérodimères puis des homodimères, qui après analyse par le logiciel GeneScanning™ de Roche donne un profil HRM avec des groupes d'échantillons (Normal, 50 % hétérozygote, 20 % hétérozygote, 10 % hétérozygote et indéterminé).

Dans une démarche de qualité, nous avons effectué la validation de la méthode pour les gènes KRAS (exon 2), REGF (exons 18 à 21) et BRAF (exon 15) par une démarche et un ensemble d'opérations réalisées conformément aux exigences du § 5.5.2 de la norme NF EN ISO 15189:2007 et selon les recommandations du guide SH GTA 04 révision 00 avril 2011 (<http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>).

Cette validation technique a été effectuée sur les prélèvements colique et pulmonaire arrivés dans le laboratoire pour les dosages de routine, sur un STIC KRAS MOKAECM, un STIC REGF ERMETIC-2 et sur des prélèvements de CCR de patients marocains. Des contrôles de qualité externes sont organisés également pour un certain nombre de gènes afin de s'assurer de la justesse de notre technique.

B.Principe et intérêt de la technique de criblage

La technique consiste en l'analyse de la courbe de dissociation du produit de PCR : la montée en température d'une solution contenant l'amplicon et un fluorophore intercalant (EvaGreen®) provoque la séparation des brins anti-complémentaires de l'amplicon, et donc la «libération» du fluorophore et la diminution de la fluorescence. La température de dissociation du produit amplifié est caractéristique de sa composition en GC, de l'enchaînement de ses bases, de sa taille et de la composition en sel du milieu réactionnel ; ainsi, les mutations deviennent détectables car elles modifient la courbe de dissociation.

La technique de criblage par qPCR-HRM (high resolution melting curve), permet d'éviter le séquençage inutile des ADN non mutés. Tout le contenu des exons est séquencé afin de rechercher des mutations de résistance rares ou de nouvelles mutations.

Le mélange réactionnel de PCR (HRM Master Mix 2X®, Roche) contient une molécule fluorescente (EvaGreen®) qui fluoresce à 535 nm quand elle est intercalée dans l'ADN double brin.

L'étape de distribution des échantillons et du mix, en plaques 96 puits, est automatisée (Evo75®, Tecan). Des échantillons de référence mutés (lignées cellulaires) ainsi que de l'ADN normal (placenta) sont inclus dans l'analyse en même temps que les échantillons à analyser. La PCR est ensuite réalisée sur le LightCycler® 480, (Roche). La mesure consiste en l'analyse de la courbe de

dissociation (fusion) des produits de PCR grâce au logiciel GeneScanning (LightCycler® 480, Roche). Les profils de dissociation des échantillons à analyser sont comparés aux échantillons de référence, permettant de les classer en cas "normaux" ou "anormaux". Par la suite, seuls les échantillons de profils anormaux ou douteux sont séquencés. La valeur prédictive négative de ce test est validée sur 250 échantillons, dans le but de ne pas séquencer les échantillons normaux.

Bien que l'analyse de la qPCR-HRM se fasse en "point final", c'est à dire à la fin de la phase d'amplification PCR, la réaction présente une phase exponentielle qui permet de déduire la quantité d'ADN total initiale par rapport à un échantillon de référence et de mettre en évidence l'éventuelle présence d'inhibiteur de PCR.

La PCR est réalisée sur une plaque de 96 puits. Chaque puits contient 18µl de mélange réactionnel préparé avec du Mix 2X®, des amorces sens et antisens diluées à 10µM, et de l'eau stérile, et 2µl d'ADN à amplifier. Les puits sont remplis en réalisant des duplicatas. La plaque de PCR contient, en plus des ADN de patients, de placenta et de lignées mutées diluées, également des contrôles négatifs appelés « zéro déparaffinage » contenant les réactifs utilisés lors de l'action de la pronase, « zéro extraction » correspondant à l'extraction d'un puits vide et « zéro PCR » contenant uniquement le mélange réactionnel de PCR.

Cette technique peut être considérée comme une première technique de mise en évidence d'altération génomique (Wittwer High-résolution DNA melting Analysis 2009).

Le criblage par qPCR-HRM, pourquoi ?

Le séquençage est largement reconnu comme le « Gold Standard » en matière de mutations, mais sa sensibilité (20%) oblige à trouver d'autres méthodes de criblage.

La publication de Chen N et col. (44) confirme le rôle de référence du séquençage Sanger, signale son coût élevé, et plaide pour le développement de méthodes de criblage (screening methods).

[...] Extensive allelic heterogeneity necessitates analysis of all exons and splice sites to identify mutations for individual patients. Although Sanger sequencing is the gold standard for mutation detection, screening methods supplemented with targeted sequencing can provide a cost-effective alternative.

C. La chaîne analytique dans son ensemble

Le résultat d'une méthode qualitative n'apporte pas d'information sur la quantité de l'analyte, mais seulement sur sa présence ou non, ou l'identification de la caractéristique recherchée. Il est possible d'utiliser des techniques de biologie moléculaire développées en interne à partir de données issues de publications scientifiques et des bases de données internet (séquences, variants, logiciels d'analyses de séquences...).

La méthode de validation présentée suit les exigences du § 5.5.2 de la norme NF EN ISO 15189:2007 et les recommandations du guide technique d'accréditation de validation (portée B) de méthode en biologie médicale (SH GTA 04 – Avril 2011).

La méthode, mise en œuvre, est divisée des trois étapes définies ci-dessous :

Tableau 2 : Méthode de validation de la chaîne analytique en 3 étapes

Déparaffinage des prélèvements tissulaires fixés, inclus en paraffine, et extraction d'ADN à partir du matériel collecté par grattage des lames déparaffinées.		
« Déparaffinage – extraction »	<ul style="list-style-type: none"> • Principe • Critères d'acceptabilité • Résultats 	
Résultats : Recherche d'homologies entre couples d'amorces sélectionnés et génome de Rat	<ul style="list-style-type: none"> • Contamination croisée : étude théorique 	
Criblage des mutations par analyse des profils de dissociation d'amplicons par qPCR-HRM (<i>High Resolution Melting</i>) sur thermocycleur-enregistreur Roche LC 480.		
« Criblage de mutations par qPCR-HRM »	<ul style="list-style-type: none"> • Principe • Critères d'acceptabilité • Résultats non spécifiques 	
Résultats 1 : K-ras exon 2 Résultats 2 : REGF exon 18 Résultats 3 : REGF exon 19 Résultats 5 : REGF exon 21 Résultats 6 : BRAF exon 15	Résultats spécifiques à chaque gène analysé, Evaluations Externes de Qualité.	
Caractérisation des mutations par séquençage sur séquenceur Applied-Biosystems.		
	<ul style="list-style-type: none"> • Principe • Critères d'acceptabilité • Résultats non spécifiques 	

R
é
s
u
l
t
a
t
s
1

:
K
-
r
a
s
e
x
o
n
2

R
é
s
u
l
t
a
t
s
2

:
R
E
G
F

e
x
o
n
1
8

R
é
s
u
l

Résultats spécifique à chaque

gène analysé,
Evaluations Externes de Qualité.

Il est nécessaire dans un premier temps de définir les critères de performance minimum auxquels la chaîne analytique doit se conformer. Dans un 2^{ième} temps

nous avons défini les besoins et les protocoles à mettre en œuvre pour vérifier si la technique dans son ensemble répond à ces critères.

Le laboratoire a obtenu l'accréditation COFRAC (N° agrément 8-1739) en effectuant une validation sur ces 3 étapes (déparaffinage/extraction d'ADN, Criblage par qPCR HRM et caractérisation des mutations). Dans le chapitre suivant, je vais détailler la méthode de validation complète, mais dans le cadre de mon mémoire je ne rapporterai que les résultats de la 2nde partie, sur le criblage par qPCR HRM.

D. Définition des critères de performance pour la validation d'une méthode qualitative :

1. Spécificité analytique :

Pour les analyses qui font appel à une amplification PCR, il faut que les amorces et les conditions expérimentales permettent d'amplifier sélectivement la région ciblée. Spécificité théorique : l'alignement du système qPCR sélectionné avec Genbank *homo sapiens* ne doit pas mettre en évidence de séquences aspécifiques communes aux deux amorces.

2. Sensibilité diagnostique :

La sensibilité diagnostique regroupe les étapes pré-analytiques, la sensibilité des différentes étapes a été mesurée séparément. Elle regroupe :

↳ la composition en cellules tumorales du prélèvement : doit permettre d'identifier la ou les mutations des prélèvements présentant un pourcentage tumoral d'au moins 50%.

↳ la sensibilité de la technique d'extraction est définie par des valeurs min et max de tissus à extraire.

↳ la sensibilité de la technique de criblage : testé sur série de dilution du standard muté avec le standard non muté (1 %, 2%, 5 %, 10 %, 20 %, 50 %). La plus forte dilution permettant la détermination du statut anormal est choisie comme limite de sensibilité diagnostique. Critères d'acceptabilité de 5 % de mutants (45).

↳ la sensibilité de la technique de séquençage : 20 % de mutant (35). L'extraction doit permettre l'analyse des ADN extraits en s'assurant de la validité des résultats (quantité/qualité). Nous avons défini des tailles de prélèvements à extraire et défini un pourcentage tumoral minimum pour valider le rendu de résultats normaux. L'analyse par séquençage doit permettre d'identifier la ou les mutations des prélèvements présentant un pourcentage tumoral d'au moins 50%.

3. Domaine analytique :

↳ Déparaffinage/Extraction des ADN : Les coupes tissulaires reçues au laboratoire arrivent sous forme fixée et incluse en paraffine. La taille des coupes est au maximum d' 1cm² et au minimum de quelques mm², pour les plus petites biopsies. La taille des coupes est évaluée et classée « gros », ou « moyen », ou « petit » ou « minuscule ». Nous avons testé si, sur l'intervalle de taille des échantillons reçus au laboratoire, l'ADN extrait satisfait aux exigences analytiques. De plus, nous avons testé le rendement d'extraction sur une variation de la taille de tumeur extraite en comparant la quantité d'ADN mesurée par qPCR, et exprimée en nombre de copies d'un gène. Critères d'acceptabilité : l'ADN extrait doit permettre un coefficient de variation inférieur à 30% en PCR quantitative, sur les Cq.

↳ Absence d'inhibiteur : La présence d'inhibiteur dans l'ADN donne à la cinétique d'amplification (en qPCR ou en qPCR-HRM) un profil typique, reconnaissable à la modification de la pente de la cinétique d'amplification par rapport au standard. On parle d'un « profil inhibé » (cf. figure 15 § III B 2). L'absence d'inhibiteur dans l'ADN extrait a donc été testée par comparaison de sa cinétique d'amplification qPCR avec celle de l'ADN standard. Critères d'acceptabilité : la cinétique d'amplification de l'ADN des échantillons extraits doit présenter la même pente que celle de l'ADN standard.

↳ Intégrité de l'ADN : Pour prouver que notre technique d'extraction d'ADN n'altère pas l'intégrité de l'ADN, mais permet d'extraire l'intégralité du génome, nous avons testé le risque de perte de l'intégrité du génome. Dans notre activité diagnostique quotidienne, la mesure de proportionnalité génique compare, par quantification, le gène cible avec un gène de référence. L'intégrité de l'ADN est testée par la stabilité du rapport de dosage de deux gènes de référence, SSTR2 et β -actine. Critères d'acceptabilité : la valeur du ratio des deux gènes de référence doit être comprise entre 0.5 et 2

↳ L'analyse HRM doit permettre de détecter l'absence ou la présence de mutation. Les critères de validation sont définis comme suit : pour le statut « non muté », le résultat par cette technique devra atteindre un score de 100% de corrélation avec le résultat obtenu par séquençage. Les biologistes du laboratoire ont réclamé pour valider le criblage, l'absence de faux négatifs sur 250 prélèvements minimum issus de blocs en paraffine sur lesquels ont été réalisés HRM et séquençage.

4. Contamination entre échantillons :

Il s'agit de vérifier l'absence de transfert d'un fragment d'échantillon vers le mélange réactionnel d'un autre échantillon.

La possibilité de contamination croisée peut être liée au déparaffinage simultané de lames de différents patients dans une même cuve : l'étape de réhydratation étant réalisée dans les mêmes bains successifs, pour vingt lames simultanément, il n'est pas inconcevable théoriquement que de l'ADN se décroche d'une lame et se fixe sur une autre, ce qui constituerait une contamination. Il faut donc mesurer ce risque : absence de contamination inter-échantillons.

La contamination inter-échantillons est évaluée en mettant un blanc à la place d'un échantillon et en vérifiant qu'il reste bien négatif.

5. Robustesse

La répétabilité et la reproductibilité sont les deux extrêmes de la fidélité au sein du laboratoire. Il convient que ces 2 extrêmes soient les plus proches possible, signe de robustesse de la méthode.

a) La répétabilité

La répétabilité mesure la fidélité intra-série. Le SH GTA04 recommande 30 échantillons sur 2 zones de concentration, mais l'effectif est fonction de la fréquence et du coût de l'analyse ; elle doit être effectuée pour chaque type de matrice (sang, tissu...) utilisée. Dans le cadre d'un travail sur des acides nucléiques purifiés, nous nous limiterons à un type de matrice.

↳ Déparaffinage/Extraction : testés par la réalisation, le même jour, d'un déparaffinage suivi d'une extraction et d'une qPCR, de quinze fragments issus d'une même coupe de tissu inclus en paraffine. Critères d'acceptabilité : l'ADN extrait doit permettre un coefficient de variation (CV) inférieur ou égale à 1.5 % (Cq) en PCR quantitative.

↳ HRM : Dosage sur trente puits du même standard muté (50% hétérozygote) pour chaque gène analysé, à deux concentrations : forte ($10\text{ng}/\mu\text{l} = 3000 \text{ copies} = 1500 \text{ cellules}$) et faible ($0.1\text{ng}/\mu\text{l} = 30 \text{ copies} = 15 \text{ cellules}$), au cours d'une même expérience. Critères d'acceptabilité : Cq avec un CV de 1.5% et détection de l'échantillon en HRM comme du groupe 50 % hétérozygote.

↳ Séquençage : Dans une même série, le standard (Placenta) à été séquençé 48 fois (sur les 2 appareils). Critères d'acceptabilité : Intensité comprise entre 200 et 20 000 pour le 3500Dx et 200 et 4 000 pour le 3130, une qualité des séquences (QV) entre 20 et 50 (donné par le logiciel d'analyse SeqScape) et la séquence non muté.

b) La reproductibilité

La reproductibilité mesure la fidélité inter-séries ; elle analyse un même échantillon dans des conditions différentes : l'opérateur, les lots de réactifs, peuvent être des données variables. Elle reflète l'activité normale et quotidienne du laboratoire. Cet essai se réalise préférentiellement sur des CQI (matériel normalement stable sur la durée de l'évaluation). Le SH GTA04 recommande 30 échantillons et de faire varier au moins 2 conditions (opérateur, lot de réactif, temps...), mais là encore, tout dépend de la fréquence de l'analyse et de son coût.

↳ Déparaffinage/Extraction : Elle a été testée par l'adjonction, pendant huit semaines, d'une coupe d'un même bloc tissulaire inclus en paraffine, dans les séries hebdomadaires de notre activité de routine. Ce contrôle de qualité a été analysé huit fois pour son statut génomique (K-ras). Critère d'acceptabilité : le contrôle de qualité doit donner le même résultat sur l'ensemble des répétitions.

↳ HRM : Pour chaque série, il est noté la valeur de Cq pour chaque standard et CQI ; et il est noté la catégorie déterminée après analyse des CQI (résultat avec différents lots de réactifs, différents opérateurs, différentes dilution des ADN de lignées standard et CQI, et différents appareils). Les résultats ont été obtenus à partir d'une dizaine de séries. Critères d'acceptabilité : Cq avec un CV de 1.5% et détection de l'échantillon dans le groupe HRM attendue.

↳ Séquençage : pour les mêmes séries que pour le HRM, il a été relevé, pour les CQI et le standard, le résultat de séquençage (statut muté ou non muté) pour chaque gène. Critère d'acceptabilité : statut attendue.

6. Stabilité des réactifs (si nécessaire) :

La quasi-totalité des réactifs est fournie avec un certificat d'analyse, une date de fabrication, une date de péremption, une date d'ouverture, et des recommandations d'utilisation.

7. Comparaison avec une méthode de référence :

a) Corrélation avec le séquençage

Si les critères de performance sont établis pour une méthode de référence, comparer les résultats obtenus avec celle qui est évaluée avec ceux de la méthode de référence ;

La technique de HRM doit détecter le statut « normal » ou « anormal » d'un gène déterminé.

↳ Pour le statut « normal », le résultat par cette technique devra atteindre un score minimum de 100% de corrélation avec le résultat obtenu par séquençage (pas de faux négatifs). Ceci nous permettra de ne plus les séquençer par la suite.

↳ Pour le statut HRM « anormal » ou « douteux », séquençage obligatoire de l'amplicon pour caractériser la mutation, ce qui constitue un niveau supplémentaire d'analyse.

Afin d'évaluer le criblage de mutations par analyse des profils de dissociation HRM, nous avons procédé systématiquement à une double analyse de tous les échantillons pour lesquels était demandée une analyse moléculaire : d'abord une analyse par HRM, puis un séquençage. Nous avons estimé nécessaire d'accumuler les résultats pour environ 250 échantillons avant de pouvoir nous prononcer sur la justesse de l'analyse HRM.

b) Comparaison avec d'autres méthodes

Les STIC sont utilisés pour comparer notre méthode de détection avec d'autres approches technologiques telles que les méthodes de discrimination allélique, snapshot, pyroséquençage...

Etude STIC KRAS MOKAECM :

Projet multidisciplinaire et multicentrique national d'évaluation de la détection des Mutations de l'Oncogène K-RAS pour le traitement par les Anticorps anti-EGFR des patients porteurs d'un cancer Colorectal Métastatique

En 2008, l'Agence européenne des médicaments a recommandé la prescription du Cetuximab et du Panitumumab en 3ème ligne (après chirurgie et chimiothérapie) chez les patients porteurs d'un cancer colorectal métastatique. Ces deux anticorps sont dirigés contre le récepteur de croissance épidermique (anti-EGR).

Les patients porteurs d'un cancer colorectal métastatique ne sont répondeurs au traitement médicamenteux anti-EGFR que lorsqu'ils présentent la forme non mutée de l'oncogène KRAS. Cela rend indispensable le dépistage des mutations activatrices du gène KRAS chez les patients.

La coordination du projet est assurée par le Pr. Pierre Laurent-Puig (Hôpital Européen George Pompidou, AP-HP)

Dans ce cadre, le projet STIC MOKAECM se propose de :

I- Valider les techniques de dépistage des mutations réalisées par les différents laboratoires français participant au projet, et définir les meilleures techniques de dépistage.

II- Valider ces méthodes de détection des mutations à partir de prélèvements tumoraux fixés dans le formol et inclus en paraffine réalisés par les différents laboratoires français participant au projet. Déterminer l'impact médico-économique potentiel de la caractérisation des mutations KRAS.

Phase I : Débute en mars 2010

Elimination des méthodes de caractérisation des mutations KRAS les moins reproductibles et les moins sensibles.

Le groupe de travail a sélectionné les 8 lignées suivantes dont 7 ont des mutations KRAS connues et une n'a pas de mutation sur KRAS :

- 1 lignée KRAS sauvage WT non mutée
- 1 lignée KRAS mutée G12S
- 1 lignée KRAS mutée G12C
- 1 lignée KRAS mutée G12R
- 1 lignée KRAS mutée G12V
- 1 lignée KRAS mutée G12A
- 1 lignée KRAS mutée G12D
- 1 lignée KRAS mutée G13D

Ces lignées ont été mises en culture et l'ADN a été extrait de chacune des lignées et dilué avec de l'ADN provenant d'une lignée non mutée. Quatre dilutions seront effectuées pour chacune des lignées (100%, 50%, 25%, 5%). Le laboratoire réalisant les échantillons est indépendant des laboratoires participants et fournit les

échantillons pour la comparaison des méthodes expérimentales de caractérisation des mutations KRAS. Il séquencera les 32 échantillons - contenant de l'ADN normal mélangé à des ADN extraits de lignées cellulaires présentant des mutations de l'oncogène KRAS au niveau des codons 12 et 13 dans des proportions variables. Chaque échantillon sera divisé en 3 aliquotes pour l'étude de la reproductibilité intra-laboratoire. Ainsi un total de 96 échantillons sera fourni à chaque laboratoire. Ces échantillons d'ADN seront rendus anonymes.

Phase II :

Validation des méthodes de détection sur ADN extrait de blocs tumoraux.

24 ADN validés seront finalement adressés aux laboratoires restants pour évaluation de la reproductibilité inter-laboratoires. Parmi ces 24 ADN :

- 10 seront extraits de blocs tumoraux avec mutation de KRAS et plus de 60% de cellules tumorales dans la zone extraite après macrodissection
- 10 seront extraits de blocs tumoraux avec mutation de KRAS et de 20% à 30% de cellules tumorales dans la zone extraite après macrodissection
- 4 seront extraits de blocs tumoraux sans mutation détectable

Notre laboratoire a participé aux deux phases, mais actuellement seule la phase I a été exploitée.

Etude STIC REGF ERMETIC-2

Projet multidisciplinaire et multicentrique national d'évaluation de la recherche de mutations du récepteur de l'EGF et du KRAS pour le traitement par les inhibiteurs de tyrosine kinase des CBNPC, Apport des techniques sensibles pour la prédiction de la réponse et de la résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR.

Coordination : Pr. CADRANEL

Le projet ERMETIC-2 prolonge le projet ERMETIC, et évalue en aveugle, la détection de l'EGFR et K-Ras mutations les techniques alternatives, potentiellement plus rapides, plus sensibles et moins coûteuses que le séquençage direct, sur un grand nombre d'échantillons de tumeurs de routine.

Notre laboratoire a effectué le dosage HRM couplé au séquençage des gènes REGF exon 18 à 21 et KRAS exon 2, sur 25 échantillons en Septembre 2010. Un article va d'être soumis (46) mais nous ne l'avons toujours pas reçu.

c) Concordance avec les résultats nationaux:

Les liens ci-dessous conduisent aux études menées par l'Institut National du Cancer. Elles récapitulent les résultats (fréquence des mutations, valeurs normales...) pour les gènes impliqués dans le risque tumoral, et pour l'ensemble des plateformes de biologie moléculaire engagées.

<http://www.e-cancer.fr/presse/4181> Mutations de l'EGFR dans le cancer du poumon : mise en évidence d'une cible moléculaire permettant un accès spécifique aux thérapies ciblées

<https://www.e-cancer.fr/soins/plates-formes-hospitalieres-de-genetique-moleculaire/les-plateformes-et-les-tests-de-genetique-moleculaire> Programme INCa pour la détection des biomarqueurs émergents dans le cancer du poumon, le cancer colorectal et le mélanome : une nouvelle approche pour un accès rapide aux thérapies ciblées (448.51 kB)

+ la synthèse de l'activité des plateformes hospitalières de génétique du cancer pour la détection de biomarqueurs émergents en 2011 (pas encore diffusé sur le site e-cancer)

Les fréquences que nous obtenons doivent concorder avec les fréquences décrites.

8. Validation de la méthode par publication dans des journaux scientifiques internationaux

Deux articles écrits dans le laboratoire ont contribué à la validation de la méthode :

- Un article sur des prélèvements CCR de patients marocains qui ont permis de mettre au point la recherche de mutations sur le gène BRAF (47) (Cf. annexe).
- Et un article sur l'hétérogénéité tumorale vient d'être soumis (48).

9. Justesse

a) CQE :

Tableau 3 : Liste des CQE

Nature de l'échantillon biologique	Principe de la méthode	Gène	Date	Organisateur
KRAS exon 2 sur fixé inclus en paraffine	Amplification et criblage par HRM + Séquençage	KRAS exon 2	Décembre 2010	European EQA Program
		REGF exon 18 à 21	Mars 2011	
			EMQN	Décembre 2011
		KRAS exon 2	Mai 2012	Gen & Tiss
			Mai 2012	Laboratoire de pathologie Ambroise Paré (Boulogne)
		REGF exon 18 à 21	Mai 2012	Gen & Tiss

b) Comparaisons interlaboratoires :

KRAS, BRAF et EGFR – janvier 2012

Janvier 2012, notre laboratoire organise un échange inter laboratoire consistant en l'analyse en aveugle, de huit échantillons biologiques FFPE (Fixé à la formaline et Inclus en Paraffine).

Les analyses portent sur la détection et l'identification de mutations des gènes K-ras (exon 2) et REGF (exons 18, 19, 20 et 21).

Le laboratoire partenaire est le Service d'Anatomie Pathologique et Histologie Cytologie, CHU Rangueil, TOULOUSE, Dr Isabelle Rouquette, Praticien Hospitalier.

III.

Bibliographie

1. Wist, A. D., Berger, S. I., and Iyengar, R. Systems pharmacology and genome medicine: a future perspective. *Genome Med*, 1: 11, 2009.
2. Hill, C. and Doyon, F. [Frequency of cancer in France: 2004 update]. *Bull Cancer*, 91: 9-14, 2004.
3. Belot, A., Grosclaude, P., Bossard, N., Jouglu, E., Benhamou, E., Delafosse, P., Guizard, A. V., Molinie, F., Danzon, A., Bara, S., Bouvier, A. M., Tretarre, B., Binder-Foucard, F., Colonna, M., Daubisse, L., Hedelin, G., Launoy, G., Le Stang, N., Maynadie, M., Monnereau, A., Troussard, X., Faivre, J., Collignon, A., Janoray, I., Arveux, P., Buemi, A., Raverdy, N., Schvartz, C., Bovet, M., Cherie-Challine, L., Esteve, J., Remontet, L., and Velten, M. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique*, 56: 159-175, 2008.
4. Hill, C. Numéro thématique - Journée mondiale sans tabac. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 19-20: 209-224, 2010.
5. Peto, R., Darby, S., Deo, H., Silcocks, P., Whitley, E., and Doll, R. Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *Bmj*, 321: 323-329, 2000.
6. Berdasco, M. and Esteller, M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell*, 19: 698-711, 2010.
7. Esteller, M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet*, 16 Spec No 1: R50-59, 2007.
8. Jones, P. A. and Baylin, S. B. The epigenomics of cancer. *Cell*, 128: 683-692, 2007.
9. Artandi, S. E. and DePinho, R. A. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, 31: 9-18, 2010.
10. Farquhar, M. G. and Palade, G. E. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*, 17: 375-412, 1963.
11. Nieto, M. A. The early steps of neural crest development. *Mech Dev*, 105: 27-35, 2001.
12. Christiansen, J. J. and Rajasekaran, A. K. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*, 66: 8319-8326, 2006.
13. Peinado, H., Quintanilla, M., and Cano, A. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem*, 278: 21113-21123, 2003.
14. Xie, L., Law, B. K., Chytil, A. M., Brown, K. A., Aakre, M. E., and Moses, H. L. Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro. *Neoplasia*, 6: 603-610, 2004.
15. Kang, Y. and Massague, J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*, 118: 277-279, 2004.
16. Pardee, A. B. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*, 246: 603-608, 1989.
17. Heldin, C. H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, 80: 213-223, 1995.
18. Kaplan, D. R., Morrison, D. K., Wong, G., McCormick, F., and Williams, L. T. PDGF beta-receptor stimulates tyrosine phosphorylation of GAP and association of GAP with a signaling complex. *Cell*, 61: 125-133, 1990.
19. Pouyssegur, J. and Seuwen, K. Transmembrane receptors and intracellular pathways that control cell proliferation. *Annu Rev Physiol*, 54: 195-210, 1992.

20. Beato, M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, 56: 335-344, 1989.
21. Carson-Jurica, M. A., Schrader, W. T., and O'Malley, B. W. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr Rev*, 11: 201-220, 1990.
22. Drucker, D. J. and Brubaker, P. L. Proglucagon gene expression is regulated by a cyclic AMP-dependent pathway in rat intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 3953-3957, 1989.
23. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70, 2000.
24. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674, 2011.
25. Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A. G., Geisinger, K., Yatabe, Y., Powell, C. A., Beer, D., Riely, G., Garg, K., Austin, J. H., Rusch, V. W., Hirsch, F. R., Jett, J., Yang, P. C., and Gould, M. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma: executive summary. *Proc Am Thorac Soc*, 8: 381-385, 2011.
26. Janne, P. A., Borrás, A. M., Kuang, Y., Rogers, A. M., Joshi, V. A., Liyanage, H., Lindeman, N., Lee, J. C., Halmos, B., Maher, E. A., Distel, R. J., Meyerson, M., and Johnson, B. E. A rapid and sensitive enzymatic method for epidermal growth factor receptor mutation screening. *Clin Cancer Res*, 12: 751-758, 2006.
27. Achille, M., Gallegos-Ruiz, M., Giaccone, G., and Soria, J. C. Response to erlotinib in first-line treatment of non-small-cell lung cancer in a white male smoker with squamous-cell histology. *Clin Lung Cancer*, 8: 214-216, 2006.
28. Costa, D. B., Kobayashi, S., Tenen, D. G., and Huberman, M. S. Pooled analysis of the prospective trials of gefitinib monotherapy for EGFR-mutant non-small cell lung cancers. *Lung Cancer*, 58: 95-103, 2007.
29. Adjei, A. A. K-ras as a target for lung cancer therapy. *J Thorac Oncol*, 3: S160-163, 2008.
30. Schiller, J. H., Harrington, D., Belani, C. P., Langer, C., Sandler, A., Krook, J., Zhu, J., and Johnson, D. H. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 346: 92-98, 2002.
31. Shepherd, F. A., Dancey, J., Ramlau, R., Mattson, K., Gralla, R., O'Rourke, M., Levitan, N., Gressot, L., Vincent, M., Burkes, R., Coughlin, S., Kim, Y., and Berille, J. Prospective randomized trial of docetaxel versus best supportive care in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy. *J Clin Oncol*, 18: 2095-2103, 2000.
32. Wu, J. Y., Wu, S. G., Yang, C. H., Gow, C. H., Chang, Y. L., Yu, C. J., Shih, J. Y., and Yang, P. C. Lung cancer with epidermal growth factor receptor exon 20 mutations is associated with poor gefitinib treatment response. *Clin Cancer Res*, 14: 4877-4882, 2008.
33. Engelman, J. A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J. O., Lindeman, N., Gale, C. M., Zhao, X., Christensen, J., Kosaka, T., Holmes, A. J., Rogers, A. M., Cappuzzo, F., Mok, T., Lee, C., Johnson, B. E., Cantley, L. C., and Janne, P. A. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*, 316: 1039-1043, 2007.
34. Kim, E. S., Hirsh, V., Mok, T., Socinski, M. A., Gervais, R., Wu, Y. L., Li, L. Y., Watkins, C. L., Sellers, M. V., Lowe, E. S., Sun, Y., Liao, M. L., Osterlind, K., Reck, M., Armour, A. A., Shepherd, F. A., Lippman, S. M., and Douillard, J. Y. Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer

- (INTEREST): a randomised phase III trial. *Lancet*, 372: 1809-1818, 2008.
35. Thompson, D. M. and Gill, G. N. The EGF receptor: structure, regulation and potential role in malignancy. *Cancer Surv*, 4: 767-788, 1985.
 36. Carpenter, G. and Cohen, S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem*, 265: 7709-7712, 1990.
 37. Yarden, Y. and Ullrich, A. Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*, 57: 443-478, 1988.
 38. Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 127-137, 2001.
 39. Nicholson, R. I., Gee, J. M., and Harper, M. E. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*, 37 Suppl 4: S9-15, 2001.
 40. Gazdar, A. F. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*, 28 Suppl 1: S24-31, 2009.
 41. Rosell, R., Carcereny, E., Gervais, R., Vergnenegre, A., Massuti, B., Felip, E., Palmero, R., Garcia-Gomez, R., Pallares, C., Sanchez, J. M., Porta, R., Cobo, M., Garrido, P., Longo, F., Moran, T., Insa, A., De Marinis, F., Corre, R., Bover, I., Illiano, A., Dansin, E., de Castro, J., Milella, M., Reguart, N., Altavilla, G., Jimenez, U., Provencio, M., Moreno, M. A., Terrasa, J., Munoz-Langa, J., Valdivia, J., Isla, D., Domine, M., Molinier, O., Mazieres, J., Baize, N., Garcia-Campelo, R., Robinet, G., Rodriguez-Abreu, D., Lopez-Vivanco, G., Gebbia, V., Ferrera-Delgado, L., Bombaron, P., Bernabe, R., Bearz, A., Artal, A., Cortesi, E., Rolfo, C., Sanchez-Ronco, M., Drozdowskyj, A., Queralt, C., de Aguirre, I., Ramirez, J. L., Sanchez, J. J., Molina, M. A., Taron, M., and Paz-Ares, L. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 13: 239-246, 2012.
 42. Schubbert, S., Shannon, K., and Bollag, G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer*, 7: 295-308, 2007.
 43. Lerebours, F. [Methods of detection of mutation in human cancers]. *Bull Cancer*, 86: 877-879, 1999.
 44. Chen, N., Tranebjaerg, L., Rendtorff, N. D., and Schrijver, I. Mutation analysis of SLC26A4 for Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss by high-resolution melting. *J Mol Diagn*, 13: 416-426, 2011.
 45. Heideman, D. A., Thunnissen, F. B., Doeleman, M., Kramer, D., Verheul, H. M., Smit, E. F., Postmus, P. E., Meijer, C. J., Meijer, G. A., and Snijders, P. J. A panel of high resolution melting (HRM) technology-based assays with direct sequencing possibility for effective mutation screening of EGFR and K-ras genes. *Cell Oncol*, 31: 329-333, 2009.
 46. Beau-Faller, M., Blons, H., Domerg, C., Richard, N., Escande, F., Solassol, J., Denis, M., Cayre, A., Nanni, I., Olschwang, S., Lizard, S., Piard, F., Pretet, J., De Fraipont, F., Bièche, Y., De Cremoux, P., Rouquette, I., Bringuier, P., Mosser, J., Legrain, M., Voegeli, A., Saulnier, P., Morin, F., Pignon, J., Zalcman, G., and Cadranet, J. A multicenter blinded study evaluating EGFR and KRAS mutation testing methodologies in the clinical non-small cell lung cancer setting - IFCT/ERMETIC2 project Part 1 - Comparison of testing methods in 20 French Molecular Genetic National Cancer Institute (INCa) platforms. *J Mol Diagn*, soumis.
 47. Bennani, B., Gilles, S., Fina, F., Nanni, I., Ibrahimi, S. A., Riffi, A. A., Nejjari, C.,

- Benajeh, D. A., El Abkari, M., Martin, P. M., and Ouafik, L. Mutation analysis of BRAF exon 15 and KRAS codons 12 and 13 in Moroccan patients with colorectal cancer. *Int J Biol Markers*, 25, 2010.
48. Tomasini, P., Secq, V., Gilles, S., Rouquette, I., Carlioz, A., Nanni, I., Figarella-Branger, D., Ouafik, L. H., Barlesi, F., and Fina, F. Multiplicity and heterogeneity of molecular changes as a potential source of resistance to epidermal growth factor receptor - tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKI) in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, soumis.
 49. Wittwer, C. T. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum Mutat*, 30: 857-859, 2009.
 50. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., and Wittwer, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55: 611-622, 2009.
 51. Choi, J. E., Park, S. H., Kim, K. M., Lee, W. K., Kam, S., Cha, S. I., Kim, C. H., Kang, Y. M., Kim, Y. C., Han, S. B., Jung, T. H., and Park, J. Y. Polymorphisms in the epidermal growth factor receptor gene and the risk of primary lung cancer: a case-control study. *BMC Cancer*, 7: 199, 2007.
 52. Shigematsu, H. and Gazdar, A. F. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int J Cancer*, 118: 257-262, 2006.
 53. Zhang, H., Zheng, X., Ji, T., Fu, L., Bai, D., Liao, Y., Ding, Y., and Zheng, L. Comparative screening of K-ras mutations in colorectal cancer and lung cancer patients using a novel real-time PCR with ADx-K-ras kit and Sanger DNA sequencing. *Cell Biochem Biophys*, 62: 415-420.
 54. Blons, H. and Laurent-Puig, P. [Technical considerations for KRAS testing in colorectal cancer. The biologist's point of view]. *Bull Cancer*, 96 Suppl: S47-56, 2009.
 55. Tindall, E. A., Petersen, D. C., Woodbridge, P., Schipany, K., and Hayes, V. M. Assessing high-resolution melt curve analysis for accurate detection of gene variants in complex DNA fragments. *Hum Mutat*, 30: 876-883, 2009.
 56. Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 9236-9241, 1999.
 57. Hussein, S. M., Batada, N. N., Vuoristo, S., Ching, R. W., Autio, R., Narva, E., Ng, S., Sourour, M., Hamalainen, R., Olsson, C., Lundin, K., Mikkola, M., Trokovic, R., Peitz, M., Brustle, O., Bazett-Jones, D. P., Alitalo, K., Lahesmaa, R., Nagy, A., and Otonkoski, T. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature*, 471: 58-62, 2011.
 58. Yung, T. K., Chan, K. C., Mok, T. S., Tong, J., To, K. F., and Lo, Y. M. Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*, 15: 2076-2084, 2009.