



Place de l' ADN tumoral circulant dans la prise en charge des patients atteints d'une tumeur pulmonaire : impact pronostique et suivi dynamique de l'évolution des altérations génétiques au cours du traitement

Audrey Didelot

► **To cite this version:**

Audrey Didelot. Place de l' ADN tumoral circulant dans la prise en charge des patients atteints d'une tumeur pulmonaire : impact pronostique et suivi dynamique de l'évolution des altérations génétiques au cours du traitement. Cancer. 2017. hal-01499473

HAL Id: hal-01499473

<https://ephe.hal.science/hal-01499473>

Submitted on 31 Mar 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.



École Pratique
des Hautes Études



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

Didelot Audrey

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Place de l'ADN tumoral circulant dans la prise en charge des patients atteints d'une tumeur pulmonaire : impact pronostique et suivi dynamique de l'évolution des altérations génétiques au cours du traitement

Soutenu le 9 mars 2017 devant le jury suivant :

Dr. Gad Lapiteau Sophie	- Président
Pr. Blons Hélène	- Tuteur scientifique
Dr. Plenchette Colas Stéphanie	- Tuteur pédagogique
Pr. Leroy Karen	- Rapporteur
Dr. Lehmann-Che Jacqueline	- Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Pr. Blons Hélène

Laboratoire Inserm U1147 MEdecine Personnalisée, Pharmacogénomique, Optimisation Thérapeutique
Directeur : Pr. Pierre Laurent-Puig

Et de

Dr. Plenchette Colas Stéphanie

Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers

Directeur : DE Ali Bettaieb

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)



École Pratique
des Hautes Études



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

Didelot Audrey

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Place de l'ADN tumoral circulant dans la prise en charge des patients atteints d'une tumeur pulmonaire : impact pronostique et suivi dynamique de l'évolution des altérations génétiques au cours du traitement

Soutenu le 9 mars 2017 devant le jury suivant :

Dr. Gad Lapiteau Sophie	- Président
Pr. Blons Hélène	- Tuteur scientifique
Dr. Plenchette Colas Stéphanie	- Tuteur pédagogique
Pr. Leroy Karen	- Rapporteur
Dr. Lehmann-Che Jacqueline	- Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Pr. Blons Hélène

Laboratoire Inserm U1147 MEdecine Personnalisée, Pharmacogénomique, Optimisation Thérapeutique
Directeur : Pr. Pierre Laurent-Puig

Et de

Dr. Plenchette Colas Stéphanie

Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers

Directeur : DE Ali Bettaieb

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier le Pr. Pierre Laurent-Puig, directeur du laboratoire MEPPOT pour avoir accepté et encouragé ma reprise d'étude après plus de 5 ans passés dans son équipe.

Je remercie également le Pr. Hélène Blons, ma tutrice scientifique, pour son aide et le temps qu'elle m'a consacrée. Merci de m'avoir proposé ce projet de recherche et soutenu dans la reprise de mes études. Merci pour ta disponibilité et tes nombreux conseils, pour ta gentillesse et ta constante bonne humeur.

Je remercie le Dr. Stéphanie Plenchette Colas, qui m'a aidé dans la réalisation et la relecture de ce mémoire. Merci pour votre disponibilité et vos conseils qui m'ont guidée dans ce travail.

Je remercie les membres de mon jury d'avoir accepté de juger mon travail, et pour l'effort consacré à la relecture de ce manuscrit.

Je remercie aussi le Dr. Nicolas Pécuchet et le Dr. Eleonora Zonta pour tous les échanges que nous avons pu avoir au sujet de nos projets sur l'ADN tumoral circulant.

J'adresse des remerciements tout particulier à Delphine et Claire pour ces 8 années passées à vos côtés et pour m'avoir soutenue depuis le premier jour de mon inscription au diplôme.

Je remercie également toutes les autres filles de la P409 : Corinne, Hanane, Camille et Aurore qui ont été présentes et disponibles pendant ces deux ans de formation. Merci pour vos nombreux conseils et votre gentillesse.

Pour finir, j'adresse mes remerciements à tous les membres de l'unité Inserm U 1147 qui permettent au quotidien de travailler dans la bonne humeur et qui sont toujours disponibles et de bon conseils.

REMERCIEMENTS	3
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	6
LISTE DES DOCUMENTS EN ANNEXE	7
LISTE DES ABREVIATIONS	8
INTRODUCTION	10
I / LES CANCERS	10
1 / Epidémiologie	10
2 / Les cellules cancéreuses	12
3 / La prise en charge	14
II / LES CANCERS BRONCHIQUES	15
1 / Le système pulmonaire : les caractéristiques générales du poumon	15
2 / Epidémiologie	16
3 / Le cancer bronchique non à petites cellules : les différents types histologiques	18
4 / Les facteurs de risque du CBNPC	18
4-1 - Le tabagisme actif	19
4-2 - Le tabagisme passif	20
4-3 - Le cannabis	21
4-4 - Les expositions professionnelles	21
4-5 - les expositions non professionnelles	21
5 / Le diagnostic du CBNPC	22
5-1 - Le bilan radiologique	22
5-2 - Le bilan biologique	22
5-3 - Le bilan d'extension	23
6 / Classification des tumeurs – résultats radiologique	23
7 / Classification des tumeurs – évaluation biologique	25
7-1 - Les mutations oncogéniques dans le cancer du poumon	26
7-2 - Les inhibiteurs de tyrosine kinase	29
8 / Apparition d'une résistance au traitement	31
9 / Technique d'analyse en routine hospitalière	32
10 / Les options de traitement	32
10-1 - La chirurgie	33
10-2 - Radiothérapie, chimiothérapie et combinaison thérapeutique	33
10-3 - La thérapie ciblée	33
11 / Evaluation de la réponse au traitement	34
III / INTERET DE L'ADN TUMORAL CIRCULANT DANS LE CBNPC	35
1 / Histoire de l'ADN circulant	36
2 / Provenance de l'ADN tumoral circulant	37
3 / ADN tumoral circulant : une analyse complexe	38
3-1 - caractéristique de l'ADN libre circulant	38
3-2 - ADN tumoral circulant : une fraction de l'ADN libre circulant	40
3-3 - Des avantages	40
3-4 - Quelques exemples d'études de l'ADN tumoral circulant	41
3-5 - Techniques d'analyse	43
4 / PCR digitale : technologie RainDance™	43
5 / Séquençage haut débit nouvelle génération : technologie Ion Proton™	45
IV / LES PROBLEMATIQUES DU PROJET	47
MATERIEL ET METHODES	48
I / Etude PlaPou	48
1 / Patients	48
2 / Recueil et conservation des échantillons biologiques	48
3 / Suivi des données clinique	49

II / Extraction ADN	49
1 / Extraction ADN de la tumeur	49
2 / Extraction ADN du plasma	49
3 / Extraction ADN des lignées cellulaire	50
4 / Extraction ADN de la couche leucocytaire du prélèvement sanguin	50
III / Quantification de l'ADN	50
IV / Fragmentation de l'ADN	50
V / ADN contrôle	50
VI / Digitale PCR : technique de PCR en microgouttelettes	51
VII / Séquençage nouvelle génération	56
VIII / Analyse statistique	58
RESULTATS	59
I / Les techniques d'extraction de l'ADN libre circulant	59
1 / Extraction ADN libre circulant	59
2 / Différentes méthodes d'extraction	59
2-1 - Technologie : colonne avec membrane de silice	59
2-2 - Technologie : séparation bille magnétique	60
3 / Comparaison de méthode et analyses	62
3-1 - Test du kit MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation	62
3-2 - Comparaison des techniques Qiagen / Promega	65
3-3 - Conclusions	68
II / Mise au point d'une technique de validation de résultat de séquençage haut débit : Base Position Error Rate	69
1 / Nouvelle approche d'analyse des résultats obtenus par NGS	69
1-1 - Optimisation des séquences	70
1-2 - Calcul du bruit de fond	70
1-3 - Taux d'erreur	70
1-4 - Filtre par biais de brins	71
1-5 - Détection d'une mutation	71
2 / Mise en place de la méthode sur des échantillons contrôles	72
3 / Validation de la technique	76
3-1 - Validation avec l'échantillon HD200 et une série de plasma	76
3-2 - Estimation de la limite de détection des hotspots	77
4 / Application sur une série d'échantillon	77
5 / Comparaison NGS - dPCR sur une série d'échantillon plasmatique	78
6 / Exemple de suivi d'un patient sous traitement	80
7 / Conclusion	82
III / Analyse de l'ADNtc dans une cohorte de patient avec un CBNPC	83
1 / Sélection des échantillons et comparaison de méthode d'analyse	84
1-1 - Sélection des échantillons	84
1-2 - Comparaison NGS - dPCR	86
2 / Lien entre la présence d'ADNtc à T0 et le pronostic de survie	89
2-1 - Présence d'ADNtc à T0	89
2-2 - Courbes de survies à T0	90
2-3 - Impact de la quantité d'ADNtc à T0 sur la survie	91
3 / Suivi précoce de la réponse tumorale via l'utilisation de l'ADNtc	93
4 / Hétérogénéité tumorale au moment de la progression	97
CONCLUSIONS	100
BIBLIOGRAPHIE	103
ANNEXES	108

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Incidence de 27 types de cancers en 2012 dans le monde. _____	11
Figure 2 : Taux de mortalité du à 27 types de cancers en 2012 dans le monde. _____	11
Figure 3 : Caractéristiques fondamentales d'une cellule cancéreuse. _____	13
Figure 4 : Représentation schématique d'un poumon humain. _____	16
Figure 5 : Tendances chronologiques pour la France du taux d'incidence et de la mortalité due au cancer du poumon chez l'homme et chez la femme de 1980 à 2010. _____	17
Figure 6 : Affiche créée pour une campagne publicitaire française contre la cigarette, 2009. _____	20
Figure 7 : Répartition des mutations EGFR associées au mécanisme de résistance dûes au traitement par ITK EGFR dans le CBNPC. _____	27
Figure 8 : Classification histologique et répartition des anomalies génétiques dans les CBNPC. _____	28
Figure 9 : Survie sans progression de patients traités par chimiothérapie ou Gefitinib. _____	30
Figure 10 : Mutations de résistance misent en évidence à la suite d'un traitement par thérapie ciblée. _____	31
Figure 11 : Intérêt de l'étude du profil génomique. _____	35
Figure 12 : Suivi de l'efficacité du traitement et détection précoce de récurrence via l'ADNt. _____	36
Figure 13 : ADN libre circulant dans le sang. _____	37
Figure 14 : Effets de différentes conditions de conservation des échantillons plasmatiques. _____	39
Figure 15 : Détection d'altération du gène EGFR dans le plasma d'un patient. _____	42
Figure 16 : Détection d'une séquence rare mutée en PCR classique et en PCR digitale. _____	44
Figure 17 : Principe de la PCR digitale. _____	52
Figure 18 : Représentation de la distribution de Poisson en fonction du nombre de molécule dans un compartiment (λ). _____	53
Figure 19 : Echantillons analysés en dPCR pour la détermination de la LOB et de la LOD de la sonde TaqMan KRAS G12C. _____	55
Figure 20 : Principe de fonctionnement du QIAasymphony® SP. _____	61
Figure 21 : Représentation graphique de la dPCR des échantillons 42PL1, 35PL7 et 48PL1. _____	63
Figure 22 : dPCR de deux échantillons extraits avec une technique Qiagen ou la technique Maxwell® RSC. _____	66
Figure 23 : Détection d'une mutation - représentation graphique des p-valeurs. _____	72
Figure 24 : Profondeur de lecture des 92 amplicons du panel Colon Lung pour les 29 échantillons contrôles. _____	72
Figure 25 : Taux d'erreur des insertions et des délétions en fonction de leur nombre de paires de bases. _____	73
Figure 26 : Bruit de fond base par base des SNV et des INDEL. _____	74
Figure 27 : Élimination des positions bruitées par l'étude de la distribution du bruit de fond à chaque position. _____	75
Figure 28 : Taux d'erreur du bruit de fond pour les 46 positions hotspots SNV et INDEL. _____	75
Figure 29 : Analyse en NGS du standard HD200. _____	76
Figure 30 : Fréquences alléliques des 152 mutations retrouvées chez les 273 ADNtc analysés par la méthode BPER. _____	78
Figure 31 : Corrélation des résultats de fréquence allélique entre le NGS-BPER et la dPCR. _____	79
Figure 32 : Suivi de l'évolution de la tumeur chez un patient avec un CBNPC : radiologie, NGS et dPCR. _____	81
Figure 33 : Description de l'étude. _____	84
Figure 34 : Évaluation de l'ADNtc chez les patients à l'initiation du traitement, à la première évaluation et à la progression. _____	85
Figure 35 : Comparaison du NGS et la dPCR dans la détection de mutation dans le plasma à T0. _____	87
Figure 36 : Corrélation des fréquences alléliques entre le NGS et la dPCR. _____	87
Figure 37 : Répartition des altérations moléculaires dans le plasma à T0, E1 et ToP. _____	88
Figure 38 : Répartition des mutations chez les 105 patients évaluable à T0. _____	90
Figure 39 : Courbes de survie sans progression et de survie globale à T0. _____	91
Figure 40 : Lien entre ADNtc, taille de la tumeur et présence de métastase hépatique. _____	92
Figure 41 : Courbes de survie en fonction des tertiles à T0. _____	93
Figure 42 : Évolution des 85 échantillons ayant un prélèvement plasmatique disponible à E1 entre T0 et E1. _____	95
Figure 43 : Détermination du délai de progression depuis T0 déterminée selon les critères RECIST ou l'ADNtc. _____	98
Figure 44 : Évolution du statut mutationnel des ADNtc entre T0 et ToP. _____	99

Tableau 1 : Evolution nationale du nombre de nouveau cas et de décès dû au cancer du poumon de 1980 à 2012.	17
Tableau 2 : Classification T.N.M proposée par l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC), 7 ^{ème} édition.	24
Tableau 3 : Classification des cancers par stade en fonction de la classification T.N.M dans la 7 ^{ème} édition.	25
Tableau 4 : Fréquence des mutations retrouvées dans les exons 18 à 21 du gène EGFR.	26
Tableau 5 : Comparaison des fréquences alléliques de 3 échantillons obtenues en NGS et en dPCR.	63
Tableau 6 : Dosage de 3 échantillons extraits manuellement ou avec le kit MagMAX™.	64
Tableau 7 : Résultat de séquençage de 6 échantillons extraits avec le kit MagMAX et un échantillon témoin.	64
Tableau 8 : Détails des échantillons A et B.	67
Tableau 9 : Taux de mutation détecté en dPCR avec la méthode manuelle Qiagen et le kit ccfDNA plasma de Promega.	67
Tableau 10 : Tableau de concordance des mutations entre l'analyse en NGS et l'analyse en dPCR.	79
Tableau 11 : Caractéristiques des 109 patients à T0.	85
Tableau 12 : Nombre de plasma T0 avec de l'ADNtc.	89
Tableau 13 : Nombre de plasma avec de l'ADNtc à T0, E1 et à ToP.	94

LISTE DES DOCUMENTS EN ANNEXE

Annexe 1 : Liste des ADN utilisés comme contrôle interne.	108
Annexe 2 : Composition du mix de dPCR et liste des réactifs.	109
Annexe 3 : Liste des sondes utilisées en dPCR.	110
Annexe 4 : Conditions de thermocyclage pour la dPCR.	111
Annexe 5 : Schéma de fonctionnement d'une sonde TaqMan®, CastPCR™ et ZEN.	112
Annexe 6 : Fonctionnement du Ion Proton.	113
Annexe 7 : Présentation de la technique d'analyse B-PER.	117
Annexe 8 : Analyse par méthode B-PER de l'ADN référence HD780.	118
Annexe 9 : Analyse par la méthode B-PER de l'ADN référence HD728.	119
Annexe 10 : Pronostique de survie à E1 en fonction du statut mutationnel des patients et de la positivité de l'ADNtc.	120
Annexe 11 : Article publié dans Clinical Chemistry en septembre 2016 : « Analysis of Base-Position Error Rate of Next-Generation Sequencing to Detect Tumor Mutations in Circulating DNA ».	121
Annexe 12 : Article publié dans PLOS Medecine en décembre 2016 : « Base-Position Error Rate Analysis of Next-Generation Sequencing Applied to Circulating Tumor DNA in Non-Small Cell Lung Cancer : A Prospective Study ».	122
Annexe 13 : Poster présenté aux assises de génétique de 2016.	123

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	acide désoxyribonucléique
ADNlc :	ADN libre circulant
ADNtc :	ADN tumoral circulant
ALK :	Anaplastic. Lymphoma Kinase
APC :	Adenomatous Polyposis Coli
BPER :	Base Position Error Rate
BRAF :	B-Raf
CBNPC :	Cancer Bronchique Non à Petites Cellules
CBPC :	Cancer Bronchique à Petites Cellules
CI :	indice de confiance
CIRC :	Centre International de Recherche sur le Cancer
CPP :	Comité de Protection des Personnes
dNTP :	deoxynucleotide
dPCR :	PCR digitale
E-SNV :	allèle mineur méthode BPER
E0-INDEL :	bruit de fond des INDEL méthode BPER
E0-SNV :	bruit de fond des SNV méthode BPER
E1 :	prélèvement à la première évaluation
EDTA :	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EGF :	Epidermal growth factor
EGFR :	Epidermal growth factor receptor
ESMO :	European Society for Medical Oncology
FAM™ :	carboxyfluorescein
FFPE :	Formalin-fixed and paraffin-embedded
H+ :	proton
HEGP	Hôpital Européen Georges Pompidou
hg19 :	génomme humain version 19
IFCT :	Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique
INCa :	Institut National Du Cancer
INDEL :	insertions / délétions
IRM :	imagerie résonnance magnétique
ITK :	Inhibiteurs de Tyrosine-Kinase
KRAS :	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LOB :	limite de blanc
LOD :	limite de détection
Mb :	million de base
N0 :	profondeur méthode BPER
NGS :	Séquençage Nouvelle Génération
NSCLC :	Non-Small Cell Lung Cancer
OMS :	statut de performance
p0-INDEL :	taux d'erreur à une position INDEL méthode BPER
p0-SNV :	taux d'erreur à une position SNV méthode BPER
pb :	paire de base
PD :	progression
PET :	tomographie par émission de positons

PIK3CA :	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
qPCR :	PCR quantitative
RC :	réponse complète
RCP :	Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
RECIST :	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
RP :	réponse partielle
SD :	stabilisation
SNV :	variations de nucléotides simples
STK11 :	Sérine-Thréonine Kinase 11
T.N.M :	tumeur primitive, adénopathies régionales, métastases à distance
T0 :	prélèvement à l'initiation du traitement
THC :	tétrahydrocannabinol
ToP :	prélèvement à la progression
TP53 :	Tumor Protein p53
UICC :	Union Internationale Contre le Cancer
VEGF :	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

INTRODUCTION

I / LES CANCERS

1 / Epidémiologie

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde. On estime globalement que pour l'année 2012, 14 millions de nouveaux cas ont été diagnostiqués. Le nombre de décès s'est élevé à 8,2 millions, en hausse de 8% par rapport aux 7,6 millions enregistrés quatre ans plus tôt.

En 2015, le nombre de nouveaux cas de cancer en France métropolitaine est estimé à 385 000 (211 000 hommes et 174 000 femmes) et le nombre de décès par cancer, à 149 500 (84 100 hommes et 65 400 femmes) avec un âge médian au diagnostic et au décès respectivement de 68 et 73 ans chez l'homme et 67 et 77 ans chez la femme (source Institut National du Cancer, (Guérin and Hill, 2010)).

Baptisé GLOBOCAN 2012 (Ferlay et al., 2015), le rapport du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) détaille les estimations pour 27 types de cancer dans 184 pays. Les cancers les plus fréquemment diagnostiqués dans le monde sont ceux du poumon (13%), du sein (11,9%) et le cancer colorectal (9,7%). Les cancers les plus mortels sont ceux du poumon (19,4%), du foie (9,1%) et de l'estomac (8,8%), (Figures 1 et 2).

Pour les années à venir, les experts du CIRC prévoient une augmentation importante du nombre de cas de cancer dans le monde à mesure que la population va augmenter et vieillir. Ils estiment environ 19,3 millions de cas en 2025. Les changements sociétaux et économiques dans les pays en développement, le basculement vers des modes de vie plus proches de ceux des pays riches contribuent à accroître le nombre de cancer.

Le rapport souligne que l'incidence du cancer – le nombre de nouveaux cas chaque année – augmente dans la plupart des pays du monde mais note « *d'énormes inégalités* » entre pays riches et pauvres. Les taux d'incidence restent les plus élevés dans les pays développés mais la mortalité est beaucoup plus forte relativement dans les pays pauvres, faute de détection précoce et d'accès aux traitements. Plus de 60% du nombre total de cas de cancer dans le monde et 70% des décès surviennent en Afrique, en Asie, en Amérique centrale et du Sud.

Il est maintenant établi l'existence d'un lien entre un certain nombre de facteurs de risque et l'apparition de cancers. Une mauvaise hygiène de vie (tabac, alcool), l'exposition professionnelle à des substances cancérigènes (amiante), l'exposition environnementale à des substances cancérigènes (ultra-violet, pesticides, pollution), certaines infections virales (virus de l'hépatite B, papillomavirus humain) font partis des facteurs de risques reconnus (source INCa, 2016).

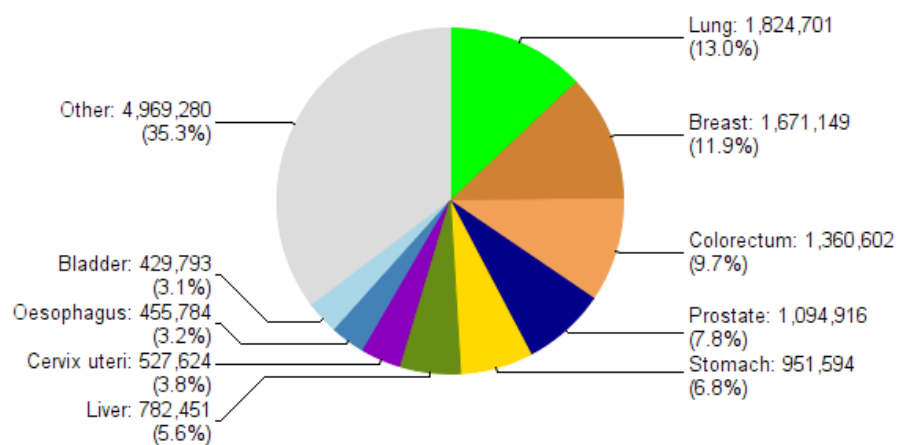


Figure 1 : Incidence de 27 types de cancers en 2012 dans le monde.

Nombre de nouveau cas de cancer diagnostiqué dans le monde en 2012 tous sexes confondus. Les cancers les plus répandus sont ceux du Poumon (13,0%), sein (11,9%) et colon-rectum (9,7%).

D'après l'étude GLOBOCAN 2012 et le Centre International de Recherche sur le Cancer

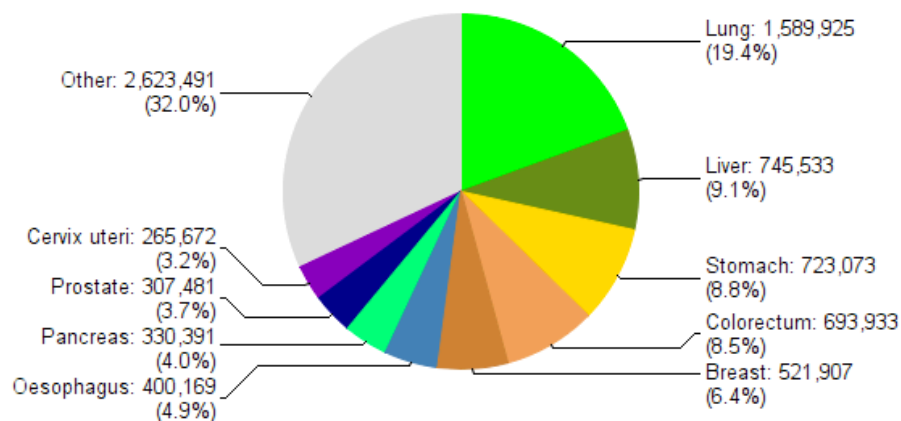


Figure 2 : Taux de mortalité du à 27 types de cancers en 2012 dans le monde.

Les cancers les plus mortels sont ceux du poumon (19,4%), de l'estomac (8,8%) et du foie (9,1%).

D'après l'étude GLOBOCAN 2012 et le Centre International de Recherche sur le Cancer.

2 / Les cellules cancéreuses

Le corps est composé de milliards de cellules qui coexistent en harmonie. Il existe un équilibre entre les cellules qui entrent en apoptose et les cellules qui les remplacent, on parle d'homéostasie tissulaire. L'organisme est doté de systèmes de régulation qui régissent cet équilibre, et le cancer est le résultat d'un échappement des cellules à ces mécanismes de régulation.

Des anomalies moléculaires touchant le patrimoine génétique des cellules sont à l'origine de ces modifications cellulaires. En effet, le cancer est une maladie de l'ADN et l'acquisition des altérations génétiques est en partie due à l'existence d'une instabilité génomique. Par exemple, des altérations des mécanismes de réparation de l'ADN sont identifiées dans les tumeurs conduisant à l'accumulation d'altérations non réparées, lesquelles peuvent survenir dans des gènes de contrôle de l'homéostasie cellulaire. La relation causale entre la survenue d'un cancer et l'existence d'altérations génétiques est clairement établie (Meijer, 2003). Toutefois, prises « individuellement », ces altérations ne sont pas, dans la grande majorité des cas, suffisantes pour transformer une cellule saine en cellule cancéreuse. C'est l'accumulation d'altérations génétiques qui entraîne progressivement la cellule vers un état malin.

Au sein d'une cellule cancéreuse, il existe une rupture permanente de l'équilibre entre les voies stimulatrices et les proliférations cellulaires qui sont activées, et les voies inhibitrices qui sont contournées. Ces altérations sont généralement somatiques, uniquement présentes dans les cellules tumorales. Elles sont une combinaison de mutations, de délétions d'un ou deux allèles, de translocations, d'amplifications de certaines régions chromosomiques. On peut définir trois classes de gènes le plus souvent touchés : les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes clés de la réparation de l'ADN.

Une cellule tumorale est une cellule qui a acquis dix propriétés élémentaires (Hanahan and Weinberg, 2000) (Hanahan and Weinberg, 2011) Figure 3 :

- L'autosuffisance vis-à-vis des signaux de croissance : par l'activation d'oncogènes la cellule peut perdre sa dépendance vis-à-vis de signaux mitogènes et proliférer de manière autonome.
- L'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs : les gènes suppresseurs de tumeurs sont garants de l'homéostasie cellulaire en inhibant la prolifération cellulaire et en induisant l'apoptose dans les cellules altérées. Ces gènes sont fréquemment inactivés dans les cellules cancéreuses. Cette inactivation permet aux cellules cancéreuses d'échapper à la mort cellulaire.
- La résistance à l'apoptose : elle peut être la conséquence d'une inactivation de gènes inducteurs de la mort cellulaire (*TP53*).
- Un potentiel réplicatif illimité : les cellules tumorales ne vieillissent plus et perdent la faculté d'entrer en sénescence.
- La capacité d'angiogenèse : la tumeur se constitue un nouveau réseau vasculaire.
- Un phénomène invasif et métastatique : cette propriété est à l'origine du pouvoir métastatique. Les cellules se transforment, modifient leurs propriétés d'adhésion par l'inactivation de protéines participant aux interactions cellules/cellules ou cellules/matrices (cadhérines, caténine) et par l'expression d'enzymes protéasiques qui dégradent la matrice

extracellulaire. Ces phénomènes permettront aux cellules de quitter la tumeur pour s'essaimer dans l'organisme.

- Une dérégulation métabolique : la capacité de modifier, ou reprogrammer, le métabolisme cellulaire afin de soutenir plus efficacement la prolifération néoplasique.
- Un échappement à la réponse immunitaire : qui permet aux cellules cancéreuses de se soustraire à la destruction immunologique, notamment par les lymphocytes T et B, les macrophages et les cellules tueuses naturelles.
- Une inflammation oncogénique : les cellules immunitaires innées destinées à lutter contre les infections et à guérir les blessures peuvent involontairement acquérir de nouvelles caractéristiques favorisant la progression tumorale. Les tumeurs étant largement apprécées des réponses inflammatoires.
- Une instabilité génomique : l'instabilité génomique et, par conséquent la mutabilité dotent les cellules cancéreuses avec des altérations génétiques qui entraînent la progression tumorale.

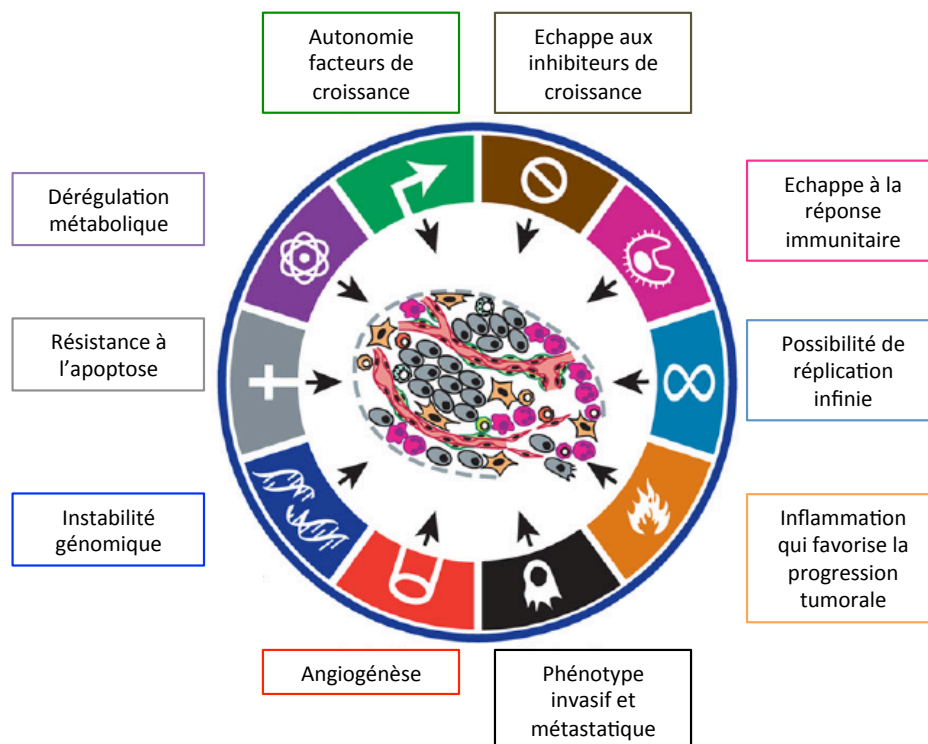


Figure 3 : Caractéristiques fondamentales d'une cellule cancéreuse.

La cellule cancéreuse peut acquérir 10 propriétés : l'autosuffisance vis-à-vis des signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, la résistance à l'apoptose, un potentiel réplcatif illimité, la capacité d'angiogenèse, un phénomène invasif et métastatique, une instabilité génomique, une dérégulation métabolique, un phénomène d'échappement à la réponse immunitaire, et une progression tumorale favorisée par l'inflammation. D'après Hanahan and Weinberg, 2011.

3 / La prise en charge

Ces dernières années ont été riches en découvertes dans le domaine de la cancérologie, tant sur le plan théorique que dans le domaine de la prise en charge des patients, avec des avancées importantes en diagnostic et dans la prise en charge thérapeutique (chimiothérapie, radiothérapie, et techniques chirurgicales).

Les années 2000 ont vu l'émergence de nouvelles molécules qui ciblent une altération cellulaire spécifique. Ces nouveaux traitements sont regroupés sous le terme de « thérapie ciblée ». Ces différents récents progrès rendent désormais possible la notion, longtemps théorique, de traitement personnalisé du cancer.

II / LES CANCERS BRONCHIQUES

Le cancer du poumon, appelé aussi cancer bronchique, est une maladie des cellules des bronches ou, des cellules qui tapissent les alvéoles pulmonaires. Il se développe à partir d'une cellule initialement normale qui se transforme, sous l'effet d'agressions comme le tabac, et se multiplie de façon anarchique.

Le cancer bronchique représente la principale pathologie tumorale à mortalité élevée en France et dans le monde (Kerr et al., 2014).

1 / Le système pulmonaire : les caractéristiques générales du poumon

Situés au niveau de la poitrine, les poumons assurent les échanges gazeux de l'organisme. Ils éliminent le gaz carbonique du sang et captent l'oxygène de l'air nécessaire à une activité cellulaire normale.

Les poumons sont des organes pairs et symétriques séparés par la région du médiastin qui contient le cœur, de grosses artères et veines, la trachée, l'œsophage et des ganglions lymphatiques. Chaque poumon est entouré d'une enveloppe, la plèvre qui a pour rôle de diminuer les frottements contre la cage thoracique occasionnée par les mouvements respiratoires.

Le poumon droit comporte trois lobes contre deux pour le poumon gauche, ils sont desservis par les bronches lobaires. La trachée donne naissance à deux bronches souches qui se divisent à l'intérieur du parenchyme pulmonaire en bronches lobaires desservant chaque lobe, puis segmentaires et, par divisions successives, en bronches de calibre de plus en plus petit, formant ainsi l'arbre bronchique intraparenchymateux. Les dernières ramifications, appelées bronchioles terminales, s'ouvrent sur les alvéoles richement vascularisées, siège des échanges gazeux (Figure 4).

L'arbre bronchique s'étend de la trachée à la bronchiole, il a un rôle essentiel dans la conduction de l'air, tandis que le poumon périphérique, qui s'étend de la bronchiole terminale à l'alvéole, permet les échanges gazeux. Lors de l'inspiration, l'air arrive par la trachée et se répartit dans les bronches, les bronchioles et les alvéoles. L'oxygène ainsi contenu dans l'air inspiré traverse les alvéoles pour passer dans le sang qui distribue ensuite l'oxygène à toutes les cellules de l'organisme. Lors de l'expiration, le gaz carbonique, rejeté par toutes les cellules du corps, est ramené vers les poumons. Il traverse la paroi des alvéoles, passe dans les bronches, et est ensuite rejeté par la trachée, le nez et la bouche.

Les cancers du poumon peuvent siéger soit au niveau de l'arbre bronchique (tumeur proximale), soit au niveau du secteur alvéolaire (tumeur distale). Des différences d'histologie et de biologie de ces tumeurs définiront des sous-types tumoraux en cancérologie pulmonaire.

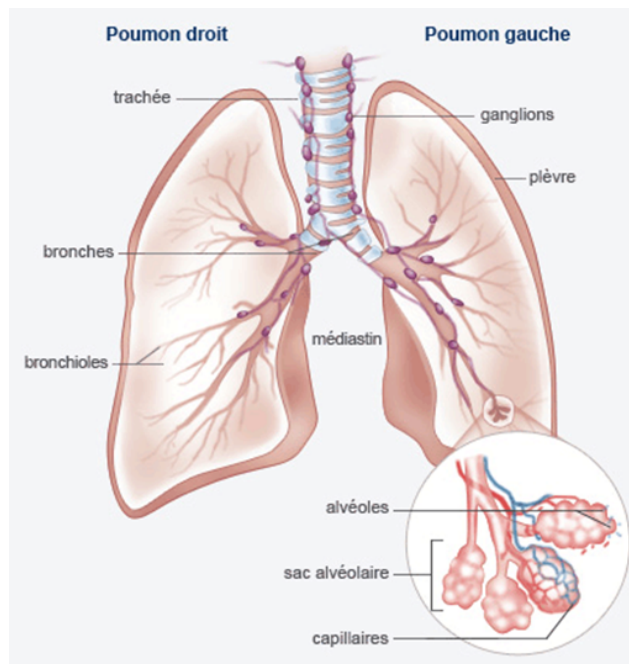


Figure 4 : Représentation schématique d'un poumon humain.

D'après ligue-cancer.net.

2 / Epidémiologie

Le cancer du poumon est l'un des cancers les plus répandus dans le monde : chaque année plus d'un million de personnes en sont atteintes.

Avec près de 45 000 nouveaux cas diagnostiqués en France en 2015, 30 400 hommes et 14 800 femmes; ce cancer se place en quatrième position des cancers les plus répandus derrière les cancers de la prostate, du sein et du colon-rectum. En revanche, il se hisse à la première place en terme de mortalité (source INCa, 2016) (Kerr et al., 2014) (Guérin and Hill, 2010).

Une propagation facilitée par une circulation sanguine intense au niveau des poumons et un diagnostic tardif, du fait de l'absence de symptômes caractéristiques, font que la survie à 5 ans n'est que de 15% (Coate et al., 2009) et que son incidence est quasi équivalente à son taux de mortalité.

Le cancer du poumon se déclare généralement entre 50 et 65 ans, il s'écoule environ 30 ans entre le moment où une fraction de la population commence à fumer et le moment où les conséquences sur la santé deviennent détectables (source INCa, mai 2010). Principal responsable: le tabagisme, incriminé dans près de 9 cas sur 10. Les cancers du poumon actuels sont les conséquences du tabagisme des 50 dernières années. Les plans de lutte antitabac et la prise de conscience assurent toutefois une baisse régulière de la mortalité chez les hommes. Malheureusement, les femmes prennent actuellement le relais, fumant de plus en plus elles entretiennent la progression constante du nombre de nouveaux cas et de décès, ce qui explique le triplement de l'incidence du cancer du poumon chez les femmes ces 20 dernières années (Source Institut de Veille Sanitaire (InVS)).

Comme illustré par le Tableau 1 et la Figure 5, le nombre de décès dû au cancer du poumon observé chez l'homme et chez la femme augmente respectivement de 40% et de 326% entre 1980 et 2012.

Chez les jeunes également, le taux de fumeurs est à la hausse depuis quelques années. Aujourd'hui, près d'un quart des individus âgés entre 15-19 ans, filles comme garçons, fument. Les cancers du poumon se déclarent désormais chez des sujets jeunes, parfois dès 40 ans.

	Sexe	Année					
		1980	1990	2000	2005	2010	2012
Incidence	Homme	16 877	19 652	23 210	25 337	27 439	28 211
	Femme	1 526	2 682	5 043	7 111	9 903	11 284
Mortalité	Homme	15 160	18 694	21 117	21 775	21 647	21 326
	Femme	2 020	2 841	4 442	5 838	7 721	8 623

Tableau 1 : Evolution nationale du nombre de nouveau cas et de décès dû au cancer du poumon de 1980 à 2012.

Une augmentation de l'incidence du cancer du poumon entre 1980 et 2012 est observée chez l'homme (+ 67%) et chez la femme (+ 639%). De même qu'une augmentation du nombre de décès dû au cancer du poumon est observée chez l'homme et chez la femme, respectivement de 40% et de 326%.

D'après P. Delafosse, F. Molinié, A. Buemi, N. Le Stang (Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1 – Tumeurs solides)

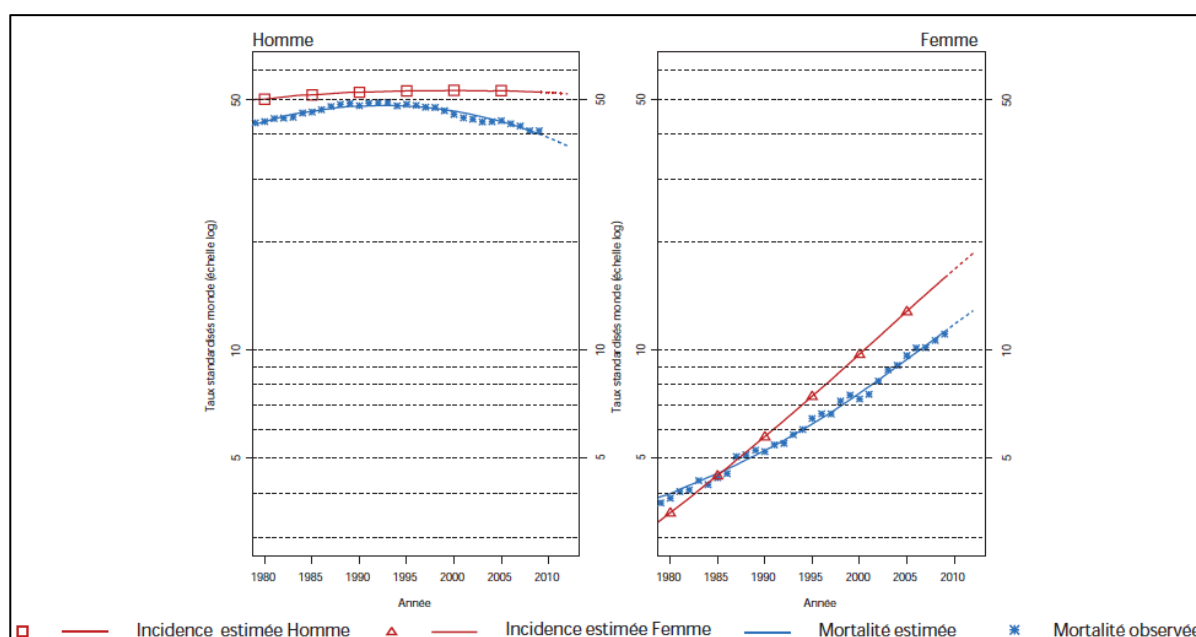


Figure 5 : Tendances chronologiques pour la France du taux d'incidence et de la mortalité due au cancer du poumon chez l'homme et chez la femme de 1980 à 2010.

Représentation graphique du taux standardisés (en log) de l'évolution de l'incidence et de la mortalité due au cancer du poumon chez l'homme et chez la femme, de 1980 à 2010 dans le monde. Pour l'homme, l'incidence du cancer du poumon est stable dans le temps tandis que le taux de mortalité décroît (perte de 10 log en 20 ans). Pour la femme, l'incidence et le taux de mortalité augmentent très rapidement (augmentation de 7 log sur 30 ans).

D'après P. Delafosse, F. Molinié, A. Buemi, N. Le Stang (Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1 – Tumeurs solides)

3 / Le cancer bronchique non à petites cellules : les différents types histologiques

Les cancers du poumon se divisent en deux grandes familles, différenciées en fonction de la nature anatomo-pathologique des cellules tumorales. Ces deux types de cancers ont des caractéristiques différentes de par leur origine, leur fréquence de métastase et leur sensibilité au traitement.

Les cancers bronchiques « à petites cellules » CBPC : ils représentent 20% des cancers du poumon. Ces cancers sont dits « agressifs » : les cellules cancéreuses se multiplient rapidement et, d'emblée, il existe un risque de métastases. Histologiquement très particuliers, ils sont d'origine neuroendocrine, et observés majoritairement chez les fumeurs. Pour ce type de cancer très lié au tabagisme, la chimiothérapie et la radiothérapie sont les traitements de référence.

Les cancers bronchique « non à petites cellules » CBNPC : ils représentent 80% des cancers du poumon et regroupent trois grands types de tumeurs : l'adénocarcinome bronchique (40%), le carcinome épidermoïde (40%), le carcinome à grandes cellules (20%). Ils sont qualifiés de non à petites cellules, par opposition aux CBPC sur la base de la taille des cellules observées au microscope. Ce sont des cancers d'origine épithéliale.

Dans le cas du carcinome épidermoïde, la tumeur se développe dans les voies respiratoires les plus larges à partir de la paroi interne de la bronche, à la bifurcation des grosses bronches. Tandis que dans le cas de l'adénocarcinome bronchique, la tumeur se développe habituellement dans les voies respiratoires les plus petites ou distales, en périphérie du poumon (alvéoles). Environ 15% des patients développent un CBNPC en l'absence d'exposition au tabac. Le sous type adénocarcinome est plus fréquent chez les femmes et chez les patients non-fumeurs.

L'objet de mon travail concerne les CBNPC, seul ce sous type histologique sera étudié par la suite.

4 / Les facteurs de risque du CBNPC

Le cancer bronchique non à petites cellules est un cancer pour lequel le tabagisme actif représente un facteur de risque établi. Ce risque dépend de la durée et de la quantité de cigarettes consommées par jour. Cependant, d'autres facteurs comme l'exposition à la fumée des autres, les expositions professionnelles ou environnementales seraient susceptibles de contribuer à son développement de manière synergique. Ce sont des facteurs à ne pas négliger d'autant qu'il s'agit de risque subis et non choisis.

Il faut savoir qu'un facteur de risque augmente l'apparition d'un cancer mais n'est ni nécessaire ni suffisant pour causer le cancer. Ce n'est pas la cause en soi.

4-1 - Le tabagisme actif

Le CBNPC est un des rares cancers ou un facteur de risque (le tabagisme : cigarette industrielle, tabac à rouler, pipe, cigare, cigarillo, narguilé) est reconnu de loin comme le principal facteur de risque. Il est responsable de près de 90% des cancers du poumon. Les fumeurs ont un risque de développer un cancer du poumon 20 fois supérieur aux individus non-fumeur.

Environ 4000 substances chimiques, dont 250 classées dangereuses pour la santé et 50 cancérogènes, sont retrouvées dans la fumée se dégageant d'une cigarette (Source : La Ligue contre le Cancer) (Figure 6). On y retrouve notamment des hydrocarbures, qui transformés sous l'action d'enzyme du métabolisme pourront se lier à l'ADN et contribuer à l'apparition de mutations. En effet le risque de conversion de G-C en A-T et la survenue de mutations pourront aboutir à l'activation d'oncogène comme *KRAS* ou l'inactivation de gène suppresseur de tumeurs comme *TP53* (Gazdar and Thun, 2007).

L'arrêt du tabac diminue significativement le risque de cancer du poumon contrairement à la simple réduction de la consommation. Par conséquent, la durée de l'exposition au tabac est quatre fois plus déterminante que la quantité de cigarettes fumées. Il est beaucoup plus dangereux de fumer 10 cigarettes par jour pendant 20 ans que de fumer 20 cigarettes par jour pendant 10 ans (source INCa, 2016). En d'autres termes, un triplement du nombre de cigarettes fumées par jour multiplie par 3 le risque de cancer, alors que le triplement de la durée du tabagisme multiplie par 100 le risque de développer un cancer bronchique.

Cette notion essentielle de durée du tabagisme comme facteur de risque du cancer du poumon a une conséquence positive : à l'arrêt du tabagisme, le risque de survenue d'un cancer du poumon diminue régulièrement avec le temps. Ce bénéfice est observé quel que soit l'âge auquel on arrête de fumer, et quelle que soit la quantité de cigarettes fumées. Par ailleurs, il n'y a pas de seuil au-dessous duquel le risque de cancer du poumon est nul, ne fumer «que» 1 à 5 cigarettes par jour n'est pas sans risque. Vis-à-vis de ce risque, il n'y a donc pas de «petit» ou de «gros» fumeur. Il n'existe pas de seuil minimal pathogène d'exposition reconnu. (Source INCa, La Ligue contre le Cancer, 2016)



Figure 6 : Affiche créée pour une campagne publicitaire française contre la cigarette, 2009.

La Ligue contre le Cancer liste 28 composants présent dans une cigarette, tous nocifs, certains mortels (Symbole ☠). D'après La Ligue contre le Cancer.

4-2 - Le tabagisme passif

Le tabagisme passif correspond à l'exposition d'un non-fumeur à la fumée de cigarette. Chez ces personnes, le risque de cancer du poumon est augmenté de 30% par rapport à une personne non exposée. On estime à quelques milliers (3 000 à 5 000), le nombre de décès par an liées au tabagisme passif.

En 2002, le Centre International de Recherche sur le Cancer a reconnu l'exposition au tabagisme passif comme cancérigène pour l'homme.

4-3 - Le cannabis

L'usage régulier de cannabis est également un facteur de risque. La fumée de cannabis contient quatre fois plus de goudrons que celle du tabac et renferme davantage de cancérigènes. Enfin le principe actif du cannabis (tétrahydrocannabinol : THC) dilate les bronches, ce qui facilite la pénétration de la fumée et de ses toxines.

4-4 - Les expositions professionnelles

On estime à 15 % la proportion des cancers du poumon non liés à l'usage régulier du tabac, et essentiellement rattachés à certaines activités professionnelles. Le nombre de cas est supérieur à la moyenne chez les professionnels en contact avec l'amiante, le radon (mines d'uranium), l'arsenic, le nickel, le chrome, les goudrons, etc. La combinaison des facteurs de risque, tabac associé à une exposition professionnelle à l'amiante par exemple, multiplie considérablement la probabilité de développement de la maladie.

L'amiante : l'amiante est un cancérigène qui a longtemps été utilisé dans une grande gamme de produits d'isolation thermique, de protection anti-incendie, d'isolation acoustique, de toiture, de revêtement de sol et intégré dans d'autres matériaux de construction. C'est l'agent le plus fréquemment mis en cause dans un cancer bronchique d'origine professionnelle.

De nos jours, compte tenu de la forte relation existant entre l'exposition à l'amiante et le cancer du poumon, de nombreux pays ont interdit l'usage de ce minéral (dont la France en 1997) ; cependant il reste encore présent dans de nombreuses constructions.

Le radon : le radon est un gaz radioactif d'origine naturelle issu de la désintégration naturelle de l'uranium de la croûte terrestre. Ce gaz est omniprésent à des niveaux très faibles dans l'air extérieur. Cependant ce type d'exposition domestique représente peu de risque. En revanche, il joue un rôle particulièrement important dans le risque de cancer du poumon chez les mineurs de fond qui sont habituellement exposés à des taux élevés de ce gaz.

Il est difficile d'évaluer le risque réel du radon mais son interaction avec d'autres polluants et cancérigènes pourrait avoir un effet synergique.

4-5 - les expositions non professionnelles

D'autres facteurs sont associés à un risque accru de cancer non lié au tabagisme, tels que la pollution atmosphérique, la pollution de l'air intérieur (fumées de cuissons, fumées des poêles à bois, charbon), les habitudes alimentaires, les facteurs viraux, et la sensibilité génétique.

Pour le moment aucune étude n'a permis de faire le rapprochement entre pollution atmosphérique ou air intérieur et cancers du poumon, mais ils pourraient jouer un rôle dans la survenue de CBNPC chez les personnes non exposées au tabac au cours de leur vie.

5 / Le diagnostic du CBNPC

Aujourd'hui, il n'existe aucun élément prouvant clairement que le dépistage précoce par un scanner doit être réalisé en routine de soin chez les personnes à risques tel que les fumeurs. Par conséquent, un cancer bronchique n'est suspecté qu'en présence de symptômes, c'est pourquoi il est souvent diagnostiqué tardivement et à un stade métastatique (75% des nouveaux cancers diagnostiqués en France sont métastatiques).

Différents symptômes laissent présager d'un cancer bronchique : une toux persistante, une augmentation des expectorations, un essoufflement récent, un enrouement et des douleurs thoraciques. Des symptômes plus spécifiques comme des douleurs thoraciques ou un épanchement pleural et des difficultés à avaler peuvent être causés par l'atteinte des nerfs de la paroi thoracique, de la plèvre, du péricarde ou de l'œsophage. Cela peut être le signe d'une propagation du cancer au-delà du thorax.

Dans le cas où la maladie s'est propagée sous forme de métastases, le patient pourra avoir des douleurs ou symptômes liés à cette nouvelle localisation.

5-1 - Le bilan radiologique

Les examens radiologiques sont cruciaux, non seulement pour confirmer le diagnostic, mais aussi pour définir l'extension de la tumeur. Ils s'articulent autour d'une radiographie thoracique, qui peut montrer une tache sombre et irrégulière, un voile (provoqué par l'aération insuffisante du poumon) ou un épanchement pleural (présence d'un liquide opaque dans la plèvre). Et par un scanner du thorax et de la partie haute de l'abdomen, examen radiologique le plus important car il permet d'obtenir, en un seul arrêt respiratoire momentané du patient, de multiples coupes du thorax. Ainsi, il permet une évaluation précise de l'extension de la tumeur dans les poumons, il révèle des lésions invisibles lors de la radiographie pulmonaire standard, l'extension de la tumeur et ses rapports avec la plèvre, le médiastin et les vaisseaux et l'intégrité de l'autre poumon.

Toutes ces informations vont permettre de déterminer le stade du cancer (source INCa, 2016).

5-2 - Le bilan biologique

La confirmation de la présence d'une tumeur cancéreuse se fait par le biais de prélèvements réalisés au cours d'une fibroscopie bronchique ou d'une ponction trans-thoracique (biopsie) mais aussi dans

le cadre d'une chirurgie à visée curative (exérèse de la tumeur) ou diagnostic (biopsie chirurgicale). Les biopsies permettent de prélever un fragment de la tumeur dont l'examen microscopique est indispensable pour affirmer le diagnostic et obtenir des indications sur le type de cancer (cancer « à petites cellules » ou « non à petites cellules »). Il s'agit de l'examen anatomopathologique.

La biopsie va également permettre une analyse moléculaire à la recherche de mutation génétique.

De manière générale, la biopsie peut être réalisée à partir de la tumeur primaire ou à partir d'une métastase dans le cas où la maladie s'est propagée hors du poumon.

L'examen cytologique est lui aussi un examen effectué en laboratoire mais à la différence de l'examen anatomopathologique qui s'effectue sur le tissu de la tumeur, celui-ci concerne les cellules cancéreuses qui se sont spontanément détachées de la tumeur (les liquides de lavage et les sécrétions sont recueillies par fibroscopie pour rechercher des cellules cancéreuses ou par ponction pleurale (lorsqu'un épanchement pleural est présent).

5-3 - Le bilan d'extension

Le bilan d'extension permet d'évaluer l'extension du cancer aux organes proches et/ou lointains, afin de déterminer les possibilités chirurgicales éventuelles et les traitements médicaux complémentaires les plus adaptés. Les principaux examens réalisés sont le scanner abdomino-pelvien, l'échographie hépatique, la scintigraphie osseuse, l'échographie endo-oesophagienne, la tomographie par émission de positons PET scan (scanner + scintigraphie) pour déceler d'éventuels micro-nodules ainsi qu'une imagerie cérébrale IRM ou scanner, indispensable pour exclure la présence de métastases cérébrales.

6 / Classification des tumeurs – résultats radiologique

La classification de la tumeur et son évaluation biologique sont des informations indispensables pour que le patient bénéficie d'un traitement personnalisé le mieux adapté à son cancer.

L'extension de la maladie s'évalue en « stade » suivant la taille de la tumeur (de I à IV) ou en suivant la classification T.N.M de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC). C'est une combinaison de T, taille de la tumeur et invasion des tissus avoisinants T1 à T4 ; de N, atteinte ou non des ganglions lymphatiques régionaux N0 à N3 ; et de M, présence ou non de métastases ou propagation du cancer à distance ou à d'autres organes M0 à M1 (Goldstraw et al., 2011) (Tableau 2 et 3).

Le stade est un élément fondamental pour prendre une décision appropriée concernant le traitement. De manière générale, moins le stade est avancé, meilleur est le pronostic.

L'UICC a créé en 1953 un comité pour la classification anatomique des tumeurs basées sur le TNM. La première édition pour le cancer bronchique a été publiée en 1978. Nous en sommes actuellement à la 7^{ème} édition, sortie en 2009 (Sculier et al., 2014).

T - Tumeur primitive
TX : Tumeur ne peut être évaluée ou est démontrée par la présence de cellules malignes dans les expectorations ou un lavage bronchique sans visualisation de la tumeur par des examens endoscopiques ou d'imagerie T0 : Pas d'évidence de tumeur primitive Tis : Carcinome <i>in situ</i> T1 : Tumeur de 3 cm ou moins dans sa plus grande dimension, entourée par le poumon ou la plèvre viscérale, sans évidence bronchoscopique d'invasion plus proximale que la bronchique lobaire (c'est-à-dire pas la bronche souche) T1a : Tumeur de 2 cm ou moins dans sa plus grande dimension ; T1b : Tumeur de plus de 2 cm sans dépasser 3 cm dans sa plus grande dimension. T2 : Tumeur de plus de 3 cm sans dépasser 7 cm dans sa plus grande dimension ou présentant une des caractéristiques suivantes* : • atteinte de la bronche de la bronche souche à 2 cm ou plus de la carène ; • invasion de la plèvre viscérale ; • présence d'une atélectasie ou d'une pneumopathie obstructive s'étendant à la région hilare sans atteindre l'ensemble du poumon. T2a : Tumeur de plus de 3 cm sans dépasser 5 cm dans sa plus grande dimension ; T2b : Tumeur de plus de 5 cm sans dépasser 7 cm dans sa plus grande dimension. *Les tumeurs avec ces caractéristiques sont classées T2a si leur dimension est de 5 cm ou moins T3 : Tumeur de plus de 7 cm ; ou envahissant directement une des structures suivantes : la paroi thoracique (y compris la tumeur de Pancoast), le diaphragme, le nerf phrénique, la plèvre médiastinale, pleurale ou pariétale ou le péricarde ; ou une tumeur dans la bronche souche à moins de 2 cm de la carène sans l'envahir ; ou associée à une atélectasie ou une pneumopathie obstructive du poumon entier ; ou présence d'un nodule tumoral distinct dans le même lobe T4 : Tumeur de toute taille envahissant directement une des structures suivantes : médiastin, cœur, grands vaisseaux, trachée, nerf laryngé récurrent, œsophage, corps vertébral, carène ; ou présence d'un nodule tumoral distinct dans un autre lobe du poumon atteint
N - Ganglions lymphatiques régionaux
NX : Les ganglions ne peuvent pas être évalués N0 : Pas de métastase ganglionnaire lymphatique régionale N1 : Métastase dans les ganglions lymphatiques intrapulmonaires, péribronchiques et/ou hilaires ipsilatéraux, y compris par envahissement direct N2 : Métastase dans les ganglions lymphatiques médiastinaux ipsilatéraux et/ou sous-carinaux N3 : Métastase dans les ganglions lymphatiques médiastinaux contralatéraux, hilaires contralatéraux, scalènes ou sous-claviculaires ipsilatéraux ou contralatéraux
M - Métastase à distance
MX : Les métastases à distance n'ont pas pu être évaluées M0 : Absence de métastase à distance M1 : Métastase à distance : M1a : Nodule(s) tumoral(tumoraux) distinct(s) dans un lobe contralatéral ; tumeur avec nodules pleuraux ou épanchement pleural (ou péricardique) malin ; M1b : Métastase à distance.

Tableau 2 : Classification T.N.M proposée par l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC), 7^{ème} édition.

D'après l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) et Sculier et al., 2014

Cancer occulte	TX	N0	M0
Stade 0	Tis	N0	M0
Stade IA	T1a,b	N0	M0
Stade IB	T2a	N0	M0
Stage IIA	T1a,b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Stade IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stade IIIA	T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
Stade IIIB	T4	N2	M
	Tout T	N3	M0
Stade IV	Tout T	Tout N	M1

Tableau 3 : Classification des cancers par stade en fonction de la classification T.N.M dans la 7^{ème} édition.

D'après l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) et Sculier et al., 2014

7 / Classification des tumeurs – évaluation biologique

La prise en charge des patients atteints d'un CBNPC repose également sur une évaluation biologique à la recherche d'altérations moléculaires ou biomarqueurs spécifiques du tissu tumoral pouvant être la cible de nouvelles thérapies. Leur identification est un objectif de la recherche translationnelle en oncologie, on parle de médecine « personnalisée » (Coate et al., 2009).

Ces altérations constituent également un outil de choix comme marqueurs biologiques prédictifs (réponse tumorale au traitement) et pourraient s'avérer être des marqueurs pronostiques (évolution de la maladie) utiles dans la prise en charge thérapeutique des patients.

Depuis 2006, l'INCa a mis en place un programme national pour soutenir la structuration de la génétique moléculaire, en labellisant 28 plateformes hospitalières pour la réalisation des recherches de mutations. Le projet BIOMARQUEURS émergents permet, dans le cadre du soin, l'analyse élargie des altérations moléculaires des tumeurs de patients atteint d'un cancer du poumon non à petites cellules au stade métastatique.

Le panel d'altérations analysé permet d'identifier une altération génétique somatique dans près de 50% des échantillons. Les mutations du gène *EGFR* mais également d'autre biomarqueurs émergents tels que les mutations des gènes *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* sont recherchées.

Dans les cas d'adénocarcinomes, *EGFR* et *KRAS* sont les gènes retrouvés le plus fréquemment mutés. Ce sont des mutations exclusives (Suda et al., 2010). Les gènes *TP53*, *STK11* et *APC* sont également régulièrement mutés (Ding et al., 2008).

7-1 - Les mutations oncogéniques dans le cancer du poumon

7-1-1 - Les mutations courantes : *EGFR* et *KRAS*

Mutation *EGFR*

Les mutations *EGFR* sont retrouvées dans environ 10% des cancers bronchiques de la population caucasienne et 40% des cancers de la population asiatique (Coate et al., 2009) (Cadranel et al., 2013), et plus particulièrement dans les adénocarcinomes (30% de mutation *EGFR* vs 2% chez les non adénocarcinomes), chez les femmes (38% vs 10% chez les hommes), et les non-fumeurs (47% vs 7% chez les non fumeurs) (INCa 2016).

Le récepteur à l'EGF (*EGFR*) est une protéine transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs à tyrosine kinases qui contrôle plusieurs voies de signalisations intracellulaires. Dans les cellules normales, son activation est déclenchée par la fixation de son ligand, ce qui entraîne une cascade d'événements intracellulaires aboutissant à la croissance, à la prolifération et au contrôle de la mort cellulaire (activation des voies MAP kinases et de la voie PI3K/AKT). Dans les cellules cancéreuses, l'activité biologique de l'*EGFR* peut être dérégulée par des mécanismes variés : mutations du gène, surexpression de la protéine et donc induire une augmentation de la prolifération cellulaire ou la diminution de la mort cellulaire.

Les mutations du gène *EGFR* sont identifiées au sein des exons 18 à 21, codant pour le domaine tyrosine kinase du récepteur (Tableau 4). Elles se situent au niveau du site de fixation de l'ATP, qui est aussi le site de fixation des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK). Certaines mutations sont beaucoup plus fréquentes que d'autres : les mutations activatrices comme les délétions dans l'exon 19 et la mutation ponctuelle p.L858R, située dans l'exon 21, représentent à elles seules 85 % des mutations de l'*EGFR* et confèrent une grande sensibilité des cellules aux ITK (Figure 7) (Sharma et al., 2007) (Lynch et al., 2004) (Cadranel et al., 2013).

D'autres mutations confèrent au contraire une résistance au traitement par ITK-*EGFR*. En effet, les tumeurs des patients traités par ITK acquièrent une résistance secondaire à ces traitements le plus souvent due à l'apparition de la mutation p.T790M de l'exon 20 (Sharma et al., 2007). Les insertions ponctuelles dans l'exon 20 sont associées elles aussi à une mauvaise réponse aux ITK-*EGFR* (Figure 7).

EXON	MUTATIONS	FRÉQUENCE
Exon 18	G719X (X = A, C ou S)	4 %
Exon 19	Délétions dans l'exon 19	44 %
Exon 21	L858R	41 %
Exon 20	Duplications et/ou insertions	5 %
	Autres mutations faux sens	6 %

Tableau 4 : Fréquence des mutations retrouvées dans les exons 18 à 21 du gène *EGFR*.

Les mutations dans l'exon 19 et 21 représentent 85 % des mutations d'*EGFR*. Les mutations les plus courantes retrouvées sur l'exon 18 sont G719A, G719C, ou G719S (e-cancer.fr).

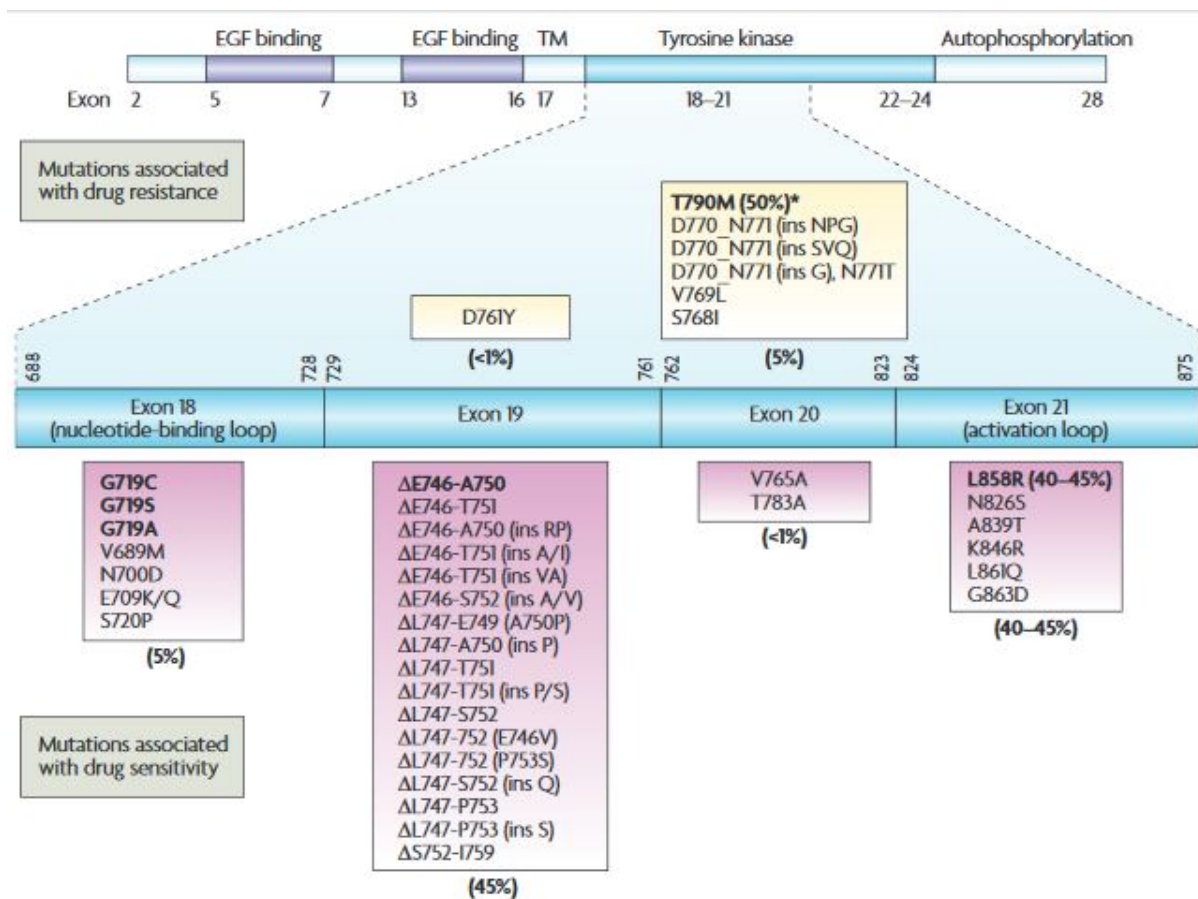


Figure 7 : Répartition des mutations EGFR associées au mécanisme de résistance dues au traitement par ITK EGFR dans le CBNPC.

Répartition des mutations EGFR sur les exons 18, 19, 20 et 21. Les mutations EGFR en jaune sont des mutations associées à la résistance au traitement (Erlotinib ou Gefitinib). Les mutations EGFR en rose sont des mutations associées à la sensibilité au traitement. (Sharma et al., 2007)

Mutation KRAS

KRAS est une protéine qui joue un rôle important dans la signalisation des récepteurs membranaires, elle participe à la signalisation entre les récepteurs membranaires et différents effecteurs intracytoplasmique, en particulier EGFR. La présence d'une mutation sur KRAS bloque la protéine sous forme active et induit une cascade de signalisation en aval responsable d'une stimulation de la voie MAP kinase qui induit divers processus de prolifération et la survie cellulaire.

Les mutations du gène *KRAS* sont retrouvées dans environ 15-30% des CBNPC, plus particulièrement les adénocarcinomes, chez les fumeurs, d'origine caucasienne (Sequist et al., 2011a)(Mascaux et al., 2005)(Linardou et al., 2008). Dans 95% des cas, les mutations se retrouvent au niveau des codons 12. Les mutants p.G12C et p.G12A qui correspondent à des transversions G>T et G>C sont particulièrement fréquents et pourraient correspondre à des hotspots associés à la consommation de tabac (Suda et al., 2010).

Les mutations *KRAS* sont associées à une résistance primaire aux ITK d'EGFR. (Linardou et al., 2008).

7-1-2 - Autres mutations oncogéniques

Le gène *BRAF* est un élément de la voie de signalisation en aval de RAS. Ses mutations sont retrouvées dans environ 5% des adénocarcinomes bronchiques. La mutation *BRAF* p.V600E représente 57% des mutations, et est surtout retrouvée chez les femmes et les non-fumeurs ; c'est un facteur négatif de pronostic (Marchetti et al., 2011).

Le réarrangement du gène *ALK* est plus fréquent chez les patients qui n'ont jamais fumé, chez les patients souffrant d'un adénocarcinome (5 %) et chez les patients les plus jeunes. Il s'agit d'une anomalie moléculaire (inversion chromosomique) qui permet la production d'une protéine de fusion au sein de laquelle le domaine tyrosine kinase de *ALK* est constitutivement actif. Le partenaire le plus fréquent est la protéine *EML4* conduisant à la production d'une chimère *EML4/ALK*.

La voie des MAP kinases passe par la cascade RAS-RAF-MEK-ERK. Cette voie de transduction joue un rôle clé dans l'homéostasie cellulaire, la progression du cycle cellulaire, la prolifération et l'invasion (Gazdar, 2010).

La voie PI3K/AKT, qui a une fonction de régulation de la survie cellulaire a elle aussi un rôle clé. *PIK3CA* est une phosphatidylinositol 3'-kinase, c'est un effecteur clé des récepteurs de facteurs de croissance. Ses mutations sont aussi fréquentes dans les carcinomes épidermoïdes que dans les adénocarcinomes.

Ci-dessous la répartition des anomalies génétiques dans les CBNPC (Figure 8).

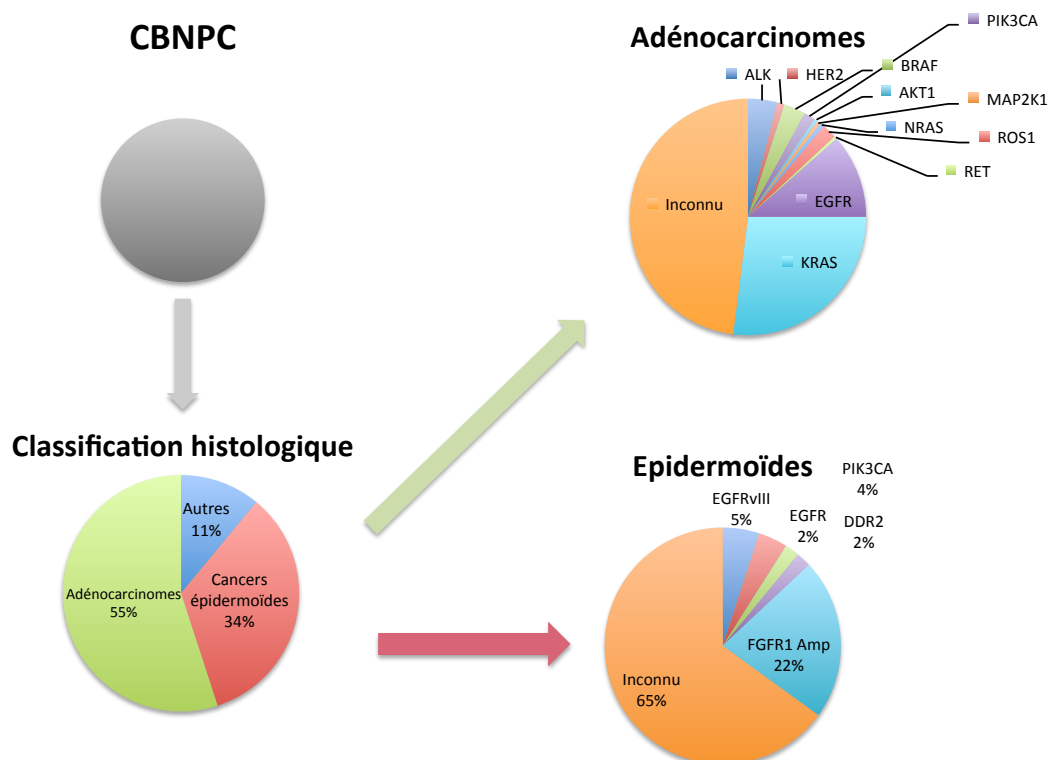


Figure 8 : Classification histologique et répartition des anomalies génétiques dans les CBNPC.

Répartition des anomalies génétiques dans les CBNPC en fonction du sous type histologique du cancer. Chez les adénocarcinomes, les anomalies génétiques les plus répandues sont celles des gènes *KRAS* et *EGFR*. Chez les épidermoïdes, l'amplification de *FGFR1* représente 22%. D'après (Li et al., 2013).

7-1-3 - gène suppresseur de tumeur *TP53*

TP53 un gène suppresseur de tumeur fréquemment muté dans les CBNPC

Le gène *TP53*, un gène suppresseur de tumeur, aussi appelé le gardien du génome, code pour un facteur de transcription qui est activé sous l'effet de stress cellulaire comme une altération de l'ADN. Il permet entre autre l'arrêt du cycle cellulaire, induit l'apoptose ou la réparation de l'ADN. Dans le cas où *TP53* est muté, la cellule n'est jamais stoppée et continue à vivre et proliférer malgré les anomalies. La mutation *TP53* est retrouvée dans 40 à 60% des CBNPC, en particulier chez les fumeurs (Liu et al., 2014).

7-2 - Les inhibiteurs de tyrosine kinase

7-2-1 - Les anti - *EGFR*

La caractérisation génétique des tumeurs a permis l'optimisation des traitements anti-tumoraux ciblés, et est une étape importante du diagnostic pour la prise en charge des patients. L'utilisation en première ligne de traitement chez les patients métastatiques d'un inhibiteur de tyrosine-kinase (ITK) du récepteur à l'EGF (Epidermal growth factor receptor : *EGFR*) (Erlotinib / Iressa®, Gefitinib / Tarceva® et Afatinib / Giotrif®) est conditionnelle à la présence d'une mutation activatrice de ce récepteur.

Bien que ces mutations soient rares (environ 10 à 20% au sein de la population caucasienne, plus fréquentes chez les non-fumeurs, de sous type adénocarcinome, les femmes et les patients d'origine asiatique), la détection d'une mutation du gène *EGFR* a des conséquences sur le pronostic et le traitement du CBNPC métastatique (Shepherd et al., 2005).

Les données de la littérature montrent le lien entre l'existence d'une altération du gène *EGFR* et l'efficacité des inhibiteurs de tyrosine kinase anti-*EGFR* (Li et al., 2013). Ainsi, l'essai mené par Tony Mok et collaborateurs en 2009 sur 1217 personnes a montré que le taux de réponse au Gefitinib est de 71,2% chez les patients porteurs de tumeurs *EGFR* mutée contre seulement 1,1% en l'absence de mutation (Mok et al., 2009). Pour les patients porteurs de tumeurs *EGFR* mutée la survie sans progression est significativement plus longue pour les patients traités par Gefitinib que pour ceux traités par chimiothérapie (Figure 9). Des résultats comparables ont été observés chez des patients traités par Erlotinib (Mok et al., 2009).

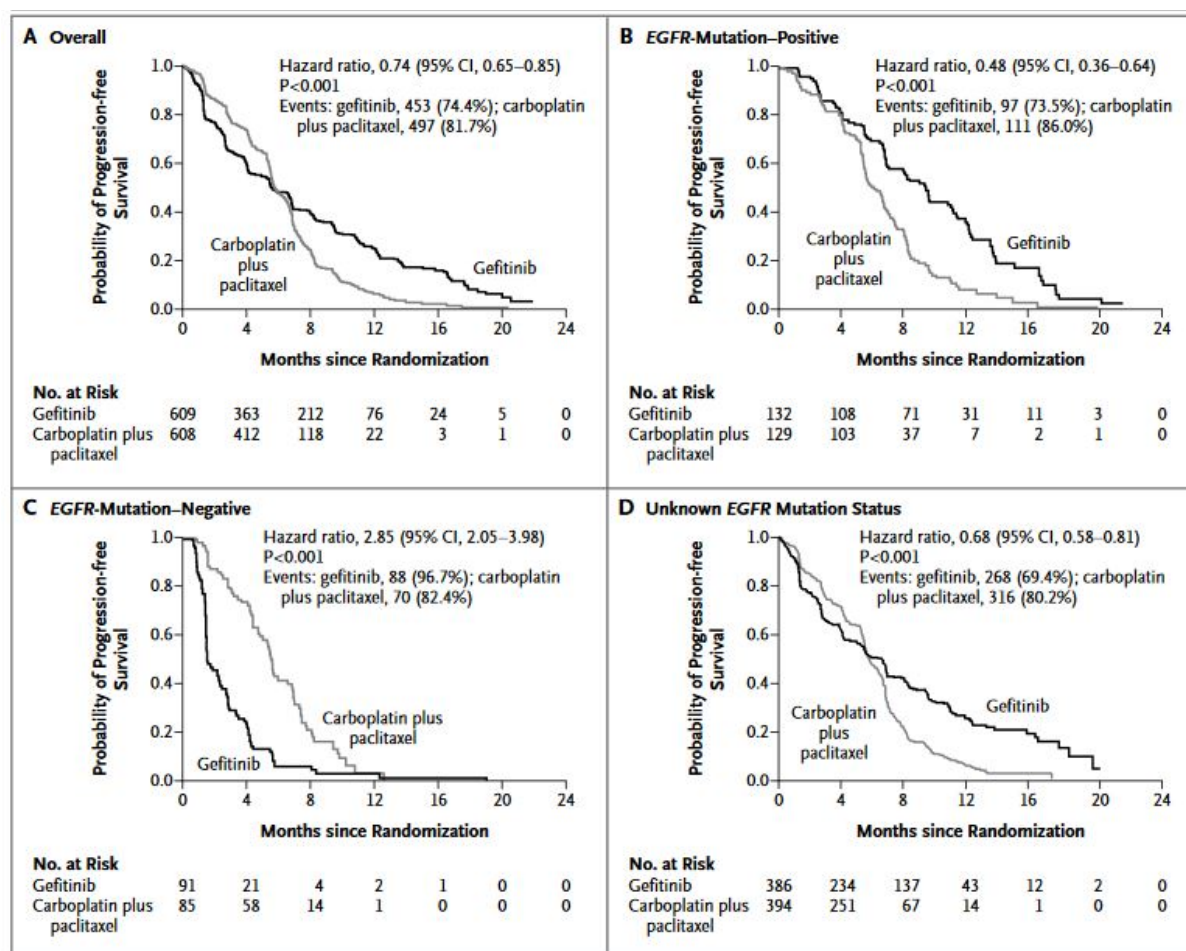


Figure 9 : Survie sans progression de patients traités par chimiothérapie ou Gefitinib.

Panel A : Courbe Kaplan-Meier de survie sans progression pour une population traitée par chimiothérapie ou par Gefitinib.
 Panel B : patients avec une mutation EGFR. La survie sans progression est meilleure chez les patients traités par Gefitinib.
 Panel C : patients sans mutation EGFR. La survie sans progression est meilleure chez les patients traités par chimiothérapie.
 Panel D : patients dont on ne connaît pas le statut mutationnel. La survie sans progression est meilleure chez les patients traités par Gefitinib. Le hazard ratio ou rapport de risque correspond au risque de décès dans un groupe par rapport à un autre. (Mok et al., 2009)

7-2-2 - Les anti - ALK

L'examen de routine de recherche du réarrangement du gène ALK est maintenant systématique et doit être réalisé, en parallèle avec la recherche de la mutation EGFR.

Une implication thérapeutique importante concerne la possibilité d'utiliser un médicament ciblant le gène ALK (Crizotinib®) chez les patients atteints de CBNPC (Solomon et al., 2014).

8 / Apparition d'une résistance au traitement

Plus de la moitié des patients initialement répondeurs traités par thérapie ciblée, vont progresser après 6-18 mois de traitement suite à l'apparition d'une résistance au traitement (Johnson and Jänne, 2005) (Wong, 2008) (Lynch et al., 2004). Plusieurs mécanismes pouvant expliquer l'émergence d'une résistance acquise ont été décrits. Dans le cas des ITK EGFR la mise en évidence d'une mutation secondaire de l'*EGFR*, la p.T790M dans l'exon 20, qui constitue une anomalie irréversible, empêcherait l'ancrage de l'ITK sur le site de fixation de l'ATP, et donc restaurerait la fonctionnalité du récepteur. C'est la mutation de résistance la plus souvent décrite (Toschi and Cappuzzo, 2010) (Sequist et al., 2011b). Un grand nombre d'autres mécanismes ont été décrits (amplification de *MET*, *HER3*, *HER2*, transition épithélio mésenchymateuse, altérations moléculaires dans la voie de signalisation d'EGFR), dont certains semblent réversibles à l'arrêt du ITK EGFR (Figure 10).

Il est possible que cette mutation de résistance soit déjà présente en tant que clone minoritaire au début de la maladie et qu'elle apparaisse sous l'effet d'une pression de sélection car elle est rarement présente chez les patients non traités (source INCa). De plus 10% des patients susceptibles d'être traités par ITK sont résistants d'emblée. La prise en charge de ces résistances secondaires va donc nécessiter à court terme la réévaluation du génotype tumoral ce d'autant que des traitements de deuxième génération peuvent être proposés à ces patients (Cadranet et al., 2013).

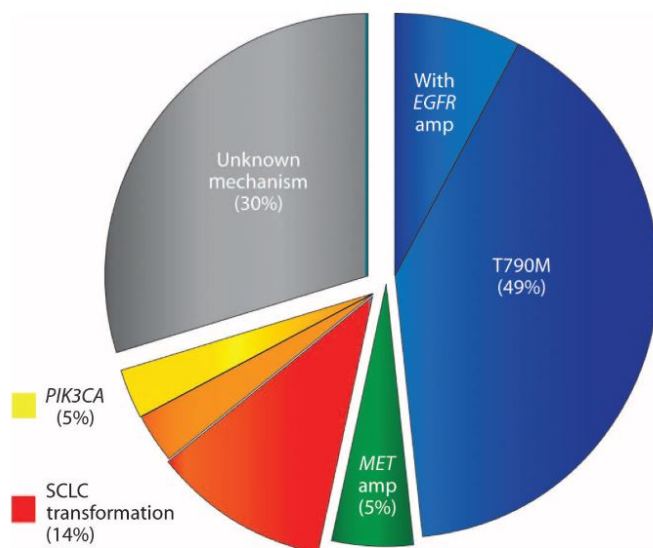


Figure 10 : Mutations de résistance mises en évidence à la suite d'un traitement par thérapie ciblée.

Prévalence des mécanismes de résistance aux ITK d'EGFR chez 37 patients avec un CBNPC, biopsiés au moment de la survenue de la résistance. Les résultats ont été comparés pré et post traitement et seul les mécanismes acquis sont décrits. La partie bleue représente les cancers qui ont développé une résistance du à la mutation T790M d'EGFR ou une amplification d'EGFR, la partie verte représente les cancers qui ont développé une amplification de MET, la partie rouge une transformation en cancer bronchique à petite cellule, le jaune les patients avec une mutation de PIK3CA, et en orange les cancers qui se sont transformés en CBPC et qui ont acquis une mutation de PIK3CA.

(Sequist et al., 2011b).

9 / Technique d'analyse en routine hospitalière

La technique de séquençage de type Sanger est la technique de référence dans la recherche des biomarqueurs à partir d'ADN issu de tissu tumoral. Elle permet d'étudier de façon exhaustive l'ADN à la recherche d'une mutation du gène. La sensibilité du séquençage nécessite la présence d'au moins 30% de cellules tumorales dans l'échantillon pour considérer comme valide un résultat négatif (Beau-Faller et al., 2014).

Les analyses basées sur les techniques de PCR spécifiques d'allèles sont plus sensibles et plus rapides que le séquençage direct (type Sanger). Elles reposent sur l'identification d'un variant génétique par une sonde spécifique et ne permettent de détecter que des mutations prédéfinies (Beau-Faller et al., 2014).

Aujourd'hui deux types d'approches se mettent en place sur les plateformes de génétique somatique hospitalières. L'utilisation des nouveaux séquenceurs de type NGS « next generation sequencing » ou séquenceur massivement parallèle qui permettent un typage beaucoup plus large, jusqu'à une centaine de gènes, et le typage de l'ADN tumoral dans le sang des patients. Ce dernier nécessite la mise au point de nouvelles techniques plus sensibles.

10 / Les options de traitement

Afin d'adapter au mieux le traitement, le médecin doit prendre en compte différents aspects du patient : son âge, son indice de performance, ses antécédents médicaux, ses résultats d'analyses de sang ainsi que ses antécédents de tabagisme. Ce sont des informations importantes à connaître tout comme les caractéristiques de son cancer : son type histologique, sa localisation, son extension, et ses altérations génétiques. Une réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) permet au corps médical d'établir un programme personnalisé de soin.

La prise en charge du cancer du poumon combinera généralement plusieurs approches complémentaires de traitement qui agiront : localement sur le cancer, comme la chirurgie ou la radiothérapie ou dans tout le corps au moyen d'un traitement systémique comme la chimiothérapie ou les médicaments de thérapie ciblée. Si une intervention est envisagée, d'autres examens seront effectués pour évaluer si la fonction pulmonaire résiduelle après ablation chirurgicale du poumon ou d'une partie de celui-ci sera suffisante pour éviter des difficultés respiratoires importantes par la suite.

Malgré la persistance d'un pronostic sombre suite à la découverte souvent tardive d'un CBNPC, il faut noter qu'au cours de ces dix dernières années, la médiane de survie globale de ces cancers a progressé d'environ 4 mois (8 à 12 mois) (Bulletin du cancer, 2009). Plusieurs facteurs sont impliqués dans ces résultats encourageants : l'amélioration de la qualité de la prise en charge des patients (soin de support, traitement de comorbidités), l'apport des thérapeutiques ciblées (anti-EGFR), les possibilités de mise en place d'une stratégie thérapeutique avec différentes lignes de traitements et l'identification de facteurs pronostics et prédictifs.

10-1 - La chirurgie

Lorsqu'elle est possible, l'ablation chirurgicale du cancer est la solution la plus adaptée. Elle constitue le traitement de référence des cancers bronchiques non à petites cellules. Sa mise en œuvre dépend de l'aptitude physiologique du patient à supporter une intervention chirurgicale ainsi que de la possibilité pour le chirurgien de retirer l'ensemble de la tumeur ainsi que les ganglions correspondants. Plusieurs types d'intervention sont possibles, la lobectomie, qui consiste à retirer uniquement le lobe où se trouve la tumeur de façon à conserver une partie du poumon ; la bilobectomie peut également être envisagée sur le poumon droit, ou la pneumonectomie qui revient à retirer tout le poumon atteint.

La chirurgie est réalisable plus particulièrement chez les patients avec des stades précoces et donc non métastatique, quand le cancer est encore localisé dans le poumon. Un traitement néoadjuvant complémentaire par radiothérapie pourra être proposé dans le cas où le volume tumoral est trop important et nécessite une réduction de la taille de la tumeur pour être opérée.

10-2 - Radiothérapie, chimiothérapie et combinaison thérapeutique

La radiothérapie est l'utilisation de rayons à haute énergie pour détruire les cellules cancéreuses, les empêcher de se multiplier et éviter la propagation locale de la maladie. Tandis que la chimiothérapie permet la diffusion systémique d'un traitement cytotoxique pour les cellules cancéreuses. A la différence de la radiothérapie, ce n'est pas un traitement localisé.

Les médicaments les plus couramment utilisés en chimiothérapie sont les sels de platine (cisplatine ou carboplatine), ils tuent les cellules cancéreuses en détériorant leur ADN et en les empêchant de se diviser, ils sont associés à une autre molécule. C'est le traitement standard chez les patients sans mutation du gène *EGFR* ni réarrangement du gène *ALK* (Goldstraw et al., 2011). Mais seulement 1 patient sur 3 répond à la chimiothérapie, c'est pourquoi de nombreux efforts ont été menés pour identifier des biomarqueurs qui pourraient aider les cliniciens à choisir le médicament approprié (Toschi and Cappuzzo, 2010).

Dans le cas où le cancer est métastatique, la chimiothérapie permet d'augmenter la durée de vie du malade ainsi que sa qualité.

Dans certain cas, une combinaison thérapeutique est possible. Elle permet de renforcer les bénéfices de la radiothérapie et de la chimiothérapie. Il y a raccourcissement de la durée du traitement et potentialisation des effets, mais également risque d'augmentation des toxicités.

10-3 - La thérapie ciblée

L'objectif de la thérapie ciblée est d'interagir spécifiquement avec une voie de signalisation anormalement activée dans les cellules cancéreuses afin de la bloquer. Ci-dessous quelques exemples de traitement (Haute Autorité de Santé, has-sante.fr).

Le **Gefitinib (Iressa®)** a obtenu une autorisation de mise sur la marché (AMM) en juin 2009 pour le traitement des patients avec une forme localement avancée ou métastatique de cancer du poumon non à petites cellules et dont la tumeur porte une mutation activatrice de l'*EGFR*. C'est un inhibiteur de la protéine tyrosine-kinase, il va venir bloquer le récepteur, une tyrosine kinase présente à la surface des cellules cancéreuses. En bloquant l'*EGFR*, le Gefitinib permet de tuer les cellules mutées et aide à ralentir la croissance et la propagation du cancer (Mok et al., 2009).

L'**Erlotinib (Tarceva®)** a obtenu une AMM en septembre 2011 pour le traitement des patients avec une forme localement avancée ou métastatique de CBNPC et dont la tumeur porte une mutation activatrice de l'*EGFR*. Il appartient au groupe des « inhibiteurs d'*EGFR* ». Il fonctionne comme le Gefitinib

L'**Afatinib (Giotrif)** est un médicament ciblé servant à traiter le cancer bronchique non à petites cellules métastatique à gène *EGFR* muté. C'est un inhibiteur irréversible du récepteur du facteur de croissance épidermique (*EGFR*) et du facteur de croissance épidermique humain 2 (*HER2*).

Les indications sont les mêmes que pour les deux précédents mais ce médicament serait plus efficace sur les mutations rares de l'*EGFR*.

Le **Crizotinib** est prescrit chez les patients atteints de cancers présentant un réarrangement du gène *ALK*.

Les inhibiteurs de tyrosine kinase de l'*EGFR* ou de *ALK* sont prescrits seuls. Ce sont des médicaments administrés par voie orale.

Le **Bevacizumab (Avastin)** est un anticorps monoclonal qui se lie au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*VEGF*), une protéine qui circule dans le sang et qui permet la croissance des vaisseaux sanguins. Le Bevacizumab empêche le *VEGF* d'activer les récepteurs *VEGF* à la surface des cellules et donc, inhibe la croissance des vaisseaux sanguins dans la tumeur. Par conséquent, les cellules cancéreuses ne peuvent pas développer leur propre apport sanguin et sont privées d'oxygène et de nutriments, ce qui favorise le ralentissement de la croissance des tumeurs. Il est prescrit en intra veineuse associé à une chimiothérapie.

11 / Evaluation de la réponse au traitement

La réponse au traitement doit être évaluée afin de vérifier la réponse tumorale, et vérifier s'il existe un quelconque bénéfice du traitement par rapport aux effets indésirables rencontrés. Un scanner thoraco-abdomino-pelvien est évalué selon les critères RECIST 1.1 avant le début du traitement puis tous les deux mois. Cette évaluation de la réponse tumorale basée sur la mesure de la lésion donne lieu à quatre critères de réponse au traitement : une réponse complète (RC : disparition de toutes lésions), une réponse partielle (RP : diminution d'au moins 30% des lésions), une progression (PD : augmentation supérieure à 20%) ou une stabilisation (SD). Ce système de suivi contraignant pour le patient ne permet pas une évaluation rapide et rapprochée de l'efficacité du traitement.

III / INTERET DE L'ADN TUMORAL CIRCULANT DANS LE CBNPC

La prise en charge des patients avec un cancer bronchique passe aujourd'hui par une évaluation clinique, anatomopathologique et biologique à la recherche d'altérations moléculaires pouvant être la cible de nouvelles thérapies. L'identification d'au moins une altération génétique spécifique du tissu tumoral constitue un marqueur tumoral. La mise en évidence d'une mutation somatique dans le sang d'un patient peut alors être évaluée dans le cadre du suivi de la tumeur.

Les résultats récemment publiés de l'étude BIOMARQUEURS-France, réalisée par l'Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique (IFCT), confirment l'intérêt de l'utilisation des biomarqueurs pour guider les traitements anti-tumoraux et améliorer le pronostic de la maladie (Barlesi et al., 2016) (Figure 11). Mais en pratique cette recherche de biomarqueurs ne peut être réalisée que chez 10 à 30% des patients en rechute (tissu non disponible, nouvelle biopsie non réalisable) (Ferte J, Massard C, AACR 2014) ce qui souligne la nécessité d'envisager des alternatives au prélèvement tissulaire pour accéder à l'ADN tumoral.

L'utilisation en routine de l'ADN tumoral circulant (ADNtc), biomarqueur sanguin tumoral, non invasif, spécifique, pourrait intervenir dans le dépistage, le diagnostic, la décision thérapeutique et le suivi des patients atteints de cancer.

Chez les patients avec un CBNPC, les mutations de la tumeur initiale peuvent être recherchées dans la plasma, avant, pendant et après traitement par exemple (Tsui and Berger, 2016a) (Figure 12).

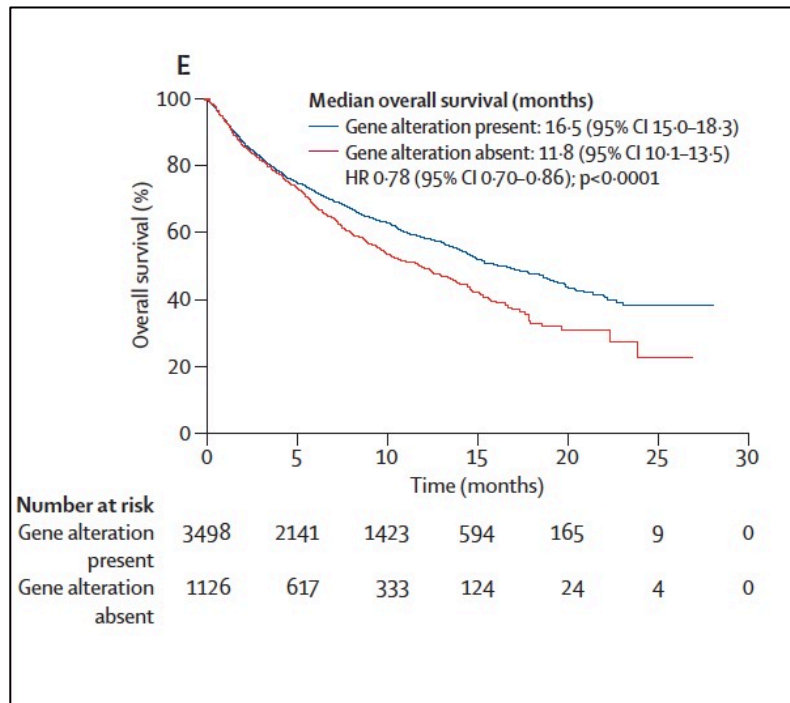


Figure 11 : Intérêt de l'étude du profil génomique.

Courbe bleue : courbe de survie globale représentant la durée de survie de patients pour lesquels une altération génétique est présente et pour lesquels le traitement a été adapté. Courbe rouge : altération génétique absente (Barlesi et al., 2016).

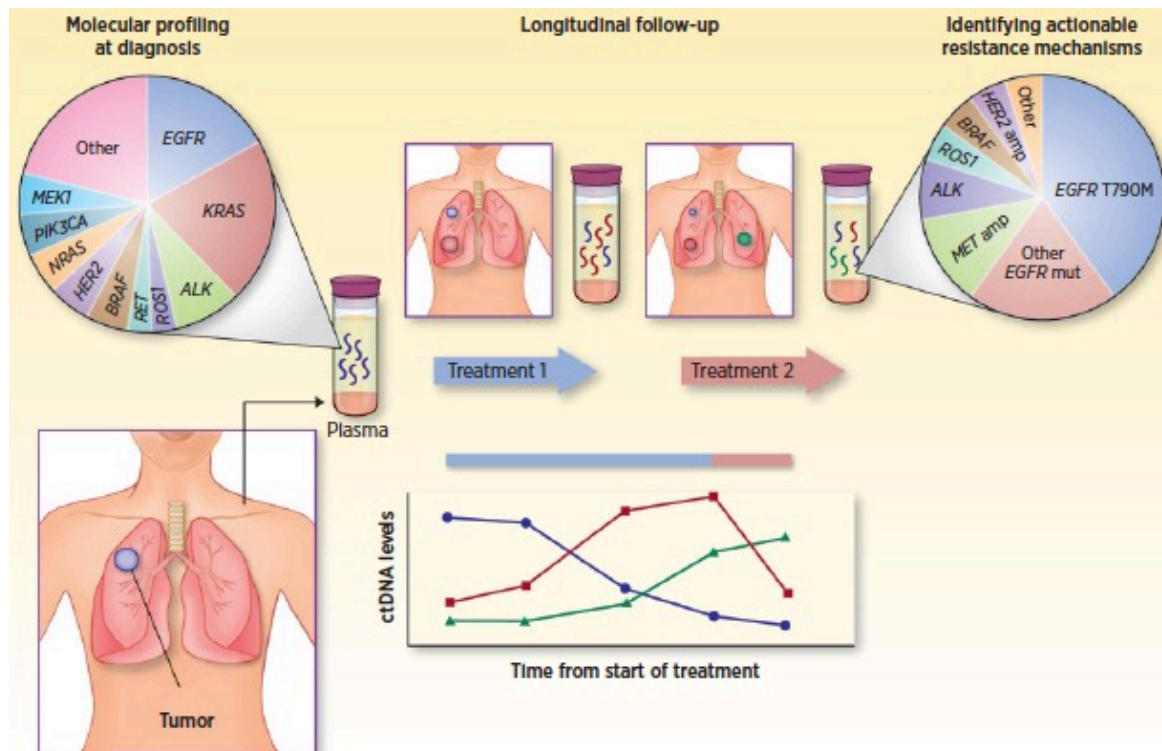


Figure 12 : Suivi de l'efficacité du traitement et détection précoce de récurrence via l'ADNt.

Chez les patients avec un CBNPC, les mutations de la tumeur initiale sont recherchées dans la plasma, avant, pendant et après le traitement. Les mutations observées au diagnostic et au moment de la résistance au traitement sont représentées dans les diagrammes circulaires (Tsui and Berger, 2016a). Le graphique représente le niveau d'ADNt dans le plasma en fonction du temps. La courbe bleue correspond à la tumeur initiale, les courbes rouge et verte correspondent à l'émergence de métastases. Le taux d'ADNt de la tumeur initiale diminue au cours du traitement tandis que l'ADNt des métastases émergent au cours du traitement.

1 / Histoire de l'ADN circulant

La présence d'acide nucléique dans le plasma a été décrite en 1948 par Mendel et Metais. C'est en 1977 que Leon et al. mettent en évidence de l'ADN circulant dans le sérum de patients atteints de cancer en quantité plus importante que chez des sujets non cancéreux. En 1994, Sorenson et ses collaborateurs démontrent l'origine tumorale de l'ADN circulant chez des patients atteints d'un cancer du pancréas, en mettant en évidence la même mutation de l'oncogène *KRAS* au niveau de l'ADN circulant et de la tumeur.

Ainsi les mutations et les translocations identifiées dans les tumeurs peuvent être retrouvées dans l'ADN libre circulant (ADNlc) et signent la présence d'ADN d'origine tumorale. L'une des caractéristiques majeures de l'ADNt est sa très grande spécificité car les altérations recherchées dans le sang sont somatiques. Le patient est son propre témoin et la détection des anomalies moléculaires tumorales dans le sang confirme la présence d'ADNt.

Depuis, des altérations somatiques spécifiques de l'ADN tumoral ont pu être détectées dans le plasma dans de nombreux cas de cancers.

2 / Provenance de l'ADN tumoral circulant

Dans la circulation sanguine, une grande proportion d'ADN circulant vient des cellules normales de l'organisme. Plusieurs mécanismes sont envisageables : nécrose ou apoptose physiologique des cellules de tissus normaux, ou destruction au niveau d'un foyer inflammatoire.

Mais l'origine précise de l'ADNtc n'est pas connue. Plusieurs hypothèses ont été proposées. L'ADN tumoral circulant proviendrait des cellules tumorales apoptotiques ou nécrotiques de la tumeur primitive. Il pourrait aussi être activement transporté à travers la membrane des cellules tumorales : libération spontanée d'ADN actif. Enfin il pourrait provenir de la lyse des cellules tumorales circulantes ou de micro métastases (Figure 13) (Diaz and Bardelli, 2014) (van der Vaart and Pretorius, 2008) (Stroun et al., 2001) (Schwarzenbach et al., 2011) (Jahr et al., 2001) (Holdenrieder and Stieber, 2004).

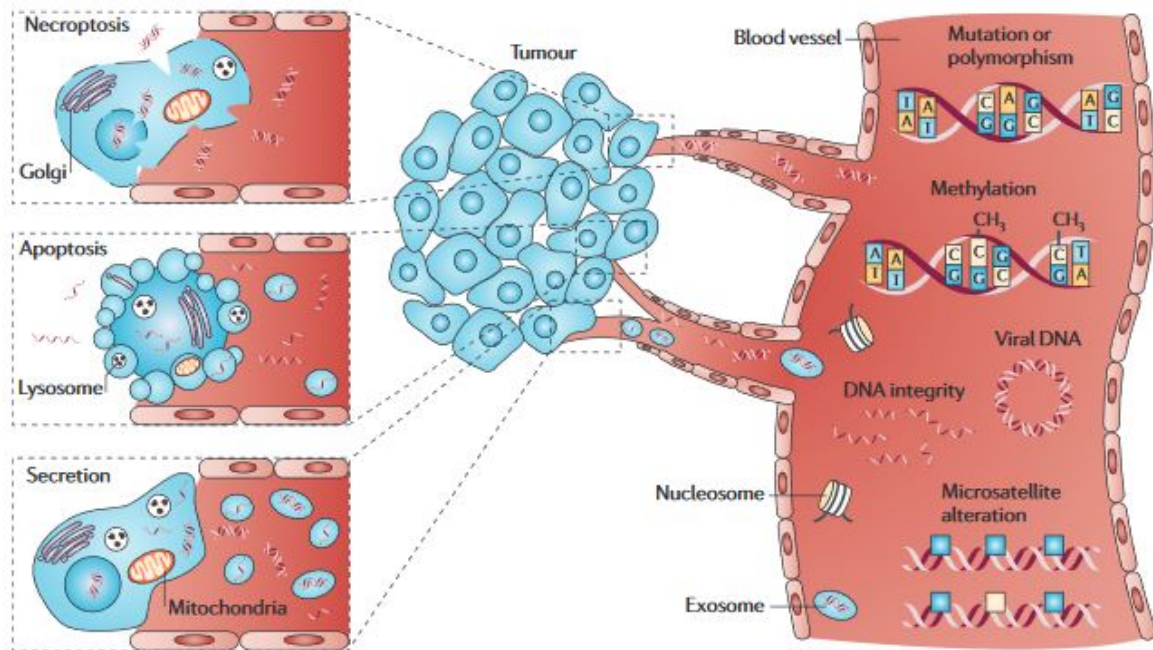


Figure 13 : ADN libre circulant dans le sang.

La tumeur a de multiples mécanismes pour libérer dans la circulation sanguine des petits fragments d'ADN : nécrose, apoptose ou sécrétion. Ces fragments sont spécifiques de la tumeur et portent les mêmes anomalies : mutation, variation du nombre de copie, réarrangement chromosomique, méthylation (Schwarzenbach et al., 2011).

3 / ADN tumoral circulant : une analyse complexe

3-1 - caractéristique de l'ADN libre circulant

Le plasma sanguin peut contenir une petite quantité d'ADNlc, à la concentration de quelques ng/mL (Diehl et al., 2005) (Lecomte et al., 2010). Sa présence est physiologique mais sa concentration augmente significativement lors des processus tumoraux, et une fraction de cet ADN libre est alors au moins partiellement d'origine tumorale : on parle d'ADN tumoral circulant (ADNtc). C'est un matériel tumoral facilement disponible via une simple prise de sang. Sa détection apparaît donc comme une méthode attrayante pour le développement de tests non-invasifs de diagnostic, de pronostic, de suivi ou de détection précoce de rechute.

Cet ADN libre circulant se présente sous forme de fragments d'ADN génomique de tailles variables. C'est un ADN double brin, très fragmenté dont la demi-vie plasmatique est courte, de l'ordre de 16 min selon une étude sur l'ADN fœtal dans le plasma maternel. Mais de nouveaux travaux ont démontrés que chez des patients dont le plasma était prélevé de manière séquentielle après résection complète de leur tumeur, le temps de demi-vie de l'ADNtc plasmatique était de 114 minutes (Diehl et al., 2005) (Lecomte et al., 2010) (Diehl et al., 2008).

L'extraction permettant d'isoler l'ADNlc doit donc idéalement être réalisée dans les heures suivant le prélèvement afin d'éviter toute dégradation. Le choix de la méthode employée est tout aussi important. En 2013, El Messaoudi et collaborateurs préconisent lors des prises de sang, l'utilisation de tube contenant de l'EDTA comme anticoagulant (El Messaoudi et al., 2013). Il permet une meilleure conservation de l'ADN, évite une trop grande contamination par les globules blancs et n'inhibe par la réaction de PCR comme l'héparinate de lithium. La séparation entre le culot globulaire et le plasma doit avoir lieu le plus tôt possible car dès la deuxième heure suivant le prélèvement le taux d'ADNlc augmente. Dans le meilleur des cas, une centrifugation dans les 4 heures est préférable et une conservation à -25°C ou -80°C est conseillée. Les étapes de congélation / décongélation sont à éviter. Du sang laissé 6 heures à température ambiante contenait jusqu'à 4 fois moins d'ADNtc qu'un prélèvement stocké à 4°C (Figure 14). Il est essentiel de conserver les échantillons au mieux et de les centrifuger au plus vite pour limiter l'effet des DNases et autres nucléases.

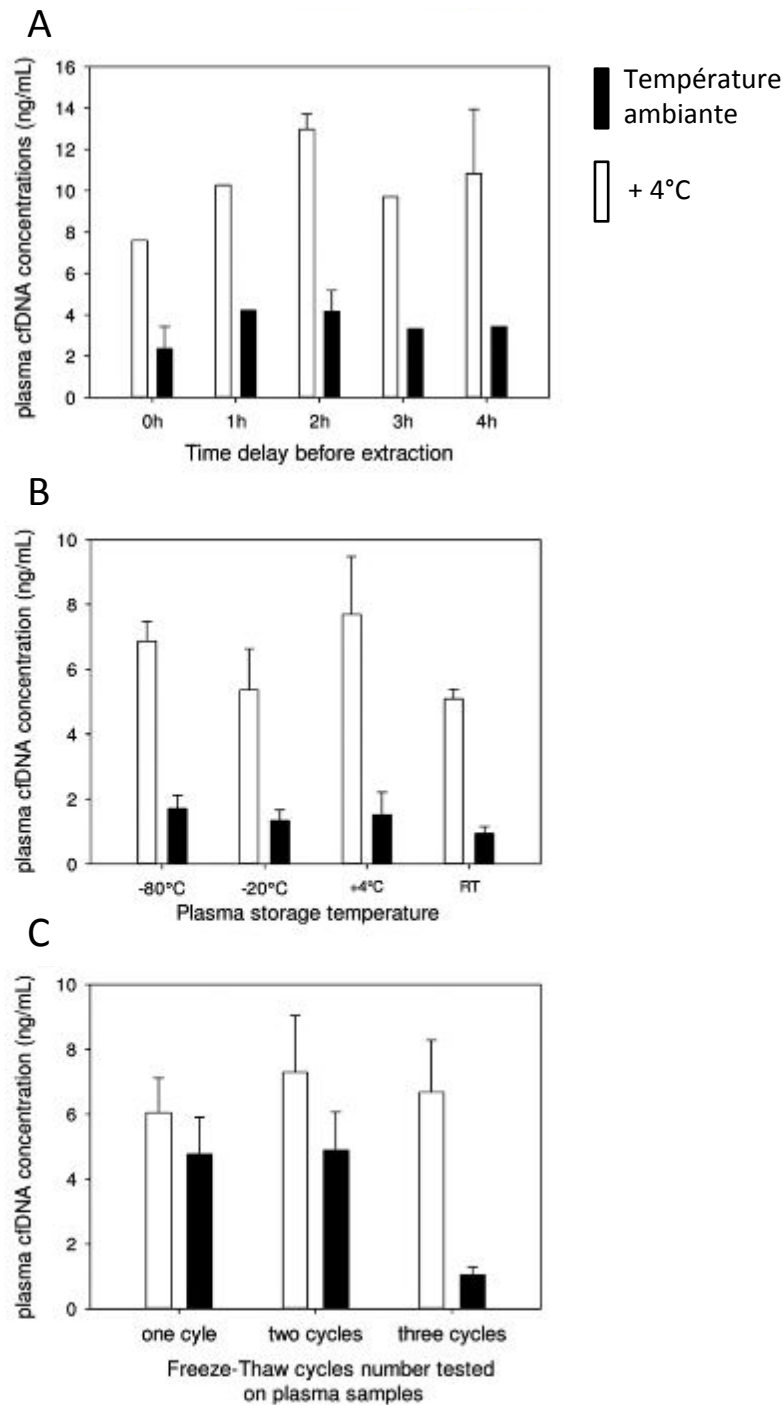


Figure 14 : Effets de différentes conditions de conservation des échantillons plasmatique.

Les tubes de sang conservés à +4°C sont représentés en blanc, les tubes de sang conservés à température ambiante sont représentés en noir. A. Comparaison de la quantité d'ADNlc (ng/mL de plasma) en fonction du temps passé par l'échantillon plasmatique à température ambiante avant extraction. B. Comparaison de la quantité d'ADNlc (ng/mL de plasma) en fonction de la température de conservation des échantillons plasmatique avant extraction. C. Comparaison de la quantité d'ADNlc (ng/mL de plasma) en fonction du nombre de cycle de congélation / décongélation réalisé avant extraction (El Messaoudi et al., 2013).

3-2 - ADN tumoral circulant : une fraction de l'ADN libre circulant

Plusieurs études ont montré que les patients ayant un CBNPC avaient un niveau d'ADNtc largement plus élevé que les individus non atteints (Yoon et al., 2009) (Lee et al., 2011) (Catarino et al., 2012). La concentration en ADNlc peut aller de 0 à plus de 1000ng/ml avec une moyenne à 180ng/ml chez les patients atteints d'un cancer bronchique contre une moyenne de 30ng/ml chez les sujets contrôles.

Mais la difficulté reste la mise en évidence de l'ADNtc. Elle réside dans l'identification de la fraction mutée dans l'ADNlc total. En effet, l'ADNtc portant les mutations spécifiques de la tumeur est fortement dilué au sein de l'ADNlc total du patient. Si l'ADNtc peut représenter jusqu'à 50% de l'ADNlc chez les patients métastatiques, il est souvent inférieur à 1% dans les stades précoces, (Lecomte et al., 2002) (Taly et al., 2013) (Thierry et al., 2014). Voir beaucoup moins : 0.01% (Diehl et al., 2005).

La détection de l'ADNtc dépend également du type de tumeur et de son stade : l'ADNtc est retrouvé dans 62 % des cancer du poumon muté EGFR (Qiu et al., 2015), dans 92% des patients avec un cancer du côlon muté KRAS (Thierry et al., 2014), et très rarement dans le cas de tumeurs cérébrales primitives.

3-3 - Des avantages

Les altérations moléculaires sont spécifiques du tissu tumoral, elles peuvent donc être utilisées comme marqueur de la présence de cellules tumorales.

L'analyse d'un large panel d'altérations moléculaires dans le plasma pourrait refléter les anomalies moléculaires de façon globale et l'hétérogénéité tumorale. En effet un typage effectué sur une biopsie peut ne pas refléter intégralement le profil moléculaire en cas d'hétérogénéité spatiale du profil moléculaire (primitif/métastase par exemple). L'ADN tumoral qui circule pourrait refléter la totalité des masses tumorales du patient. C'est un avantage sur les biopsies classiques qui, prélevées de manière ponctuelle et locale, peuvent sous-estimer cette diversité génétique.

L'un des autres avantages de la biopsie liquide est la faisabilité du prélèvement sanguin par rapport à la biopsie tissulaire. Les biopsies répétées chez un même patient ne sont pas toujours techniquement possibles et elles ne sont pas sans risque (Bosc et al., 2015). De plus leur répétition dans le temps est rarement acceptée par le patient. Pourtant cette nouvelle biopsie tissulaire peut être demandée à de nombreuses occasions : dans le cas où le pourcentage en cellules tumorales du prélèvement ne serait pas assez élevé pour permettre de valider une analyse ou encore dans le cas où le patient acquiert une résistance au traitement. La biopsie liquide, une simple prise de sang de 5mL, est un avantage non négligeable, son utilisation au quotidien simplifie la prise en charge du patient tout au long de la maladie (Tsui and Berger, 2016a).

Outre son utilité pour l'identification d'altérations génétiques ciblables, la cinétique de l'ADN circulant pourrait également être utilisée pour évaluer la réponse de la tumeur au traitement. Enfin, l'autre question est l'intérêt de ce typage dans le cadre du dépistage, en particulier dans les

populations à risque (gros fumeur) et du diagnostic précoces avant que le cancer devienne cliniquement détectable (Diaz and Bardelli, 2014).

Il reste à ce jour de nombreuses interrogations quant à la faisabilité, la robustesse et l'impact clinique attendu de cette technique en pratique de soin car les quantités d'ADNtc sont faibles et le développement et la validation dans le cadre du soin courant de techniques permettant la détection de faible quantité de mutant est nécessaire.

3-4 - Quelques exemples d'études de l'ADN tumoral circulant

- Il a été démontré que de l'ADN libre circulant présentant des altérations génétiques spécifiques de tumeurs pouvait être détecté dans le plasma de personnes atteintes de cancer (Lecomte et al., 2002). Ainsi il a été décrit que les niveaux d'ADNtc chutent après résection complète de la tumeur et augmentent si de nouvelles lésions apparaissent. Des études préliminaires ont établi la valeur pronostique de telles altérations et ont montré que la présence d'ADN tumoral circulant peut être utilisée pour identifier des patients avec un fort risque de récurrence.
- Une corrélation entre la quantité d'ADNtc tumoral circulant et le pronostic a été mise en évidence dans plusieurs études, des taux plus élevés d'ADN circulant étant associés à un moins bon pronostic. Cette quantité d'ADNtc a été rapportée chez 218 patients atteints d'un CBNPC avancé. Les patients ayant une concentration élevée d'ADNtc au diagnostic avaient un pronostic plus sombre avec une survie globale de 10 mois contre 14 mois pour les patients ayant une quantité plus faible d'ADNtc (Tissot, 2015) (Sirera, 2001).
- Plusieurs publications suggèrent l'existence de quantités plus importantes d'ADN circulant chez les patients atteints d'un cancer bronchique comparativement à une population à risque mais ne présentant pas de cancer pulmonaire. Mais le dépistage ou le diagnostic de ce type de cancer sur ce seul critère n'est pour le moment pas envisageable (Yoon et al., 2009).
- Dans les formes avancées de cancer bronchique, une normalisation du taux d'ADNtc pourrait témoigner de l'efficacité d'un traitement anti-tumoral, et le suivi de l'ADNtc permettre une surveillance de la maladie sous traitement (Figure 15) (Vallée et al., 2016).

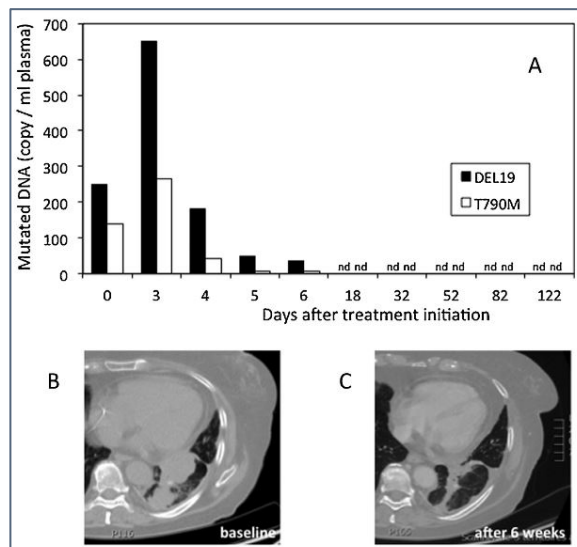


Figure 15 : Détection d'altération du gène *EGFR* dans le plasma d'un patient.

A : ADNtc est extrait à partir de 2mL de plasma avec le kit QIAamp® circulating nucleic acid (Qiagen). La délétion sur l'exon 19 d'*EGFR* en noir et la p.T790M en blanc sont détectées par amplification allèle spécifique et le nombre de copie mutée déterminée par digitale PCR. B : CT scan au début du traitement. C : Après 6 semaines de traitement (Vallée et al., 2016).

- La faisabilité de l'analyse des mutations *EGFR* dans le plasma chez les patients atteints d'un cancer pulmonaire, ainsi que la concordance des mutations *EGFR* entre le l'ADN tumoral circulant plasmatique et la tumeur a été démontrée dans une large étude (Douillard et al., 2014). Parmi les 1033 patients de cette étude ayant eu une biopsie tumorale, 201 (19%) n'ont pas pu avoir de statut mutationnel *EGFR* en raison d'une impossibilité d'accès à la tumeur ou au matériel tumoral, ce qui confirme les difficultés d'accès aux biomarqueurs pour tous les patients suivis. Dans le cas où le typage moléculaire a pu avoir lieu, la concordance des mutations retrouvée entre la tumeur et le plasma était de 94.3% avec une sensibilité de 65,7% et une spécificité de 99,8%. L'auteur propose une substitution possible de la tumeur par le plasma pour l'analyse des mutations des cancers du poumon, en préférant toute fois l'exploration tumorale si elle est disponible.

Au vu de ces résultats, l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) a étendu l'indication du Gefitinib aux patients porteurs d'une mutation de l'*EGFR* identifiée sur l'ADN tumoral circulant lorsque l'échantillon tumoral tissulaire n'est pas évaluable.

- Cette étude a été incluse dans une méta-analyse recensant 27 études et 3110 patients chez lesquels une mutation de l'*EGFR* avait été recherchée sur l'ADN tumoral circulant et sur des biopsies tumorales. La sensibilité de détection des mutations dans le plasma était de 62% et la spécificité de 95,9%. La bonne spécificité confirme qu'un résultat positif en ADN circulant doit être pris en compte pour la prescription d'un traitement anti-*EGFR*, cependant la sensibilité de détection n'est pas suffisante pour remplacer les tests moléculaires sur biopsies par l'ADN circulant, et vient plutôt se positionner comme une solution complémentaire à la biopsie tumorale. La sensibilité de détection dépend de plusieurs facteurs : du stade T.N.M., d'un éventuel traitement anticancéreux débuté avant le prélèvement sanguin, des modalités de conservation du plasma et enfin de la technique utilisée pour l'extraction et l'analyse de l'ADN tumoral plasmatique.

3-5 - Techniques d'analyse

La détection d'ADNtc demeure un défi, puisqu'il représente une très faible fraction de l'ADNlc, souvent moins de 0.01% (Diehl et al., 2005).

La recherche d'altérations tumorales dans le plasma nécessite donc la mise en place de techniques moléculaires suffisamment robustes (la quantité d'ADN est faible) et sensibles (l'ADNtc est contaminé par de l'ADNlc). Aujourd'hui, le manque de sensibilité des techniques utilisées est la principale limite pour détecter l'ADNtc dans le plasma.

Les méthodes classiques basées sur la PCR en temps réel et la détection des mutations à l'aide de sondes (TaqMan®) ou amorces spécifiques (technologie CastPCR™) ont des seuils de sensibilité de l'ordre de 0,1-1% (Didelot et al., 2012). Ces technologies d'analyse globale sont simples à mettre en œuvre et compatibles sans optimisation technologique à l'analyse en routine de soin des plasmas. Elles sont testées en première intention. Mais elles présentent des désavantages dans le cas de mélanges complexes. En effet l'ADN issu de plasma est un mélange disproportionné entre de l'ADN issu de cellules normales et cancéreuses. Si l'ADN tumoral ne représente qu'une infime partie de cet ADN total libre circulant alors il risque d'échapper à l'analyse.

Le développement de techniques comme la PCR digitale (dPCR) (limite de détection théorique de 0,001%-0,05% d'ADN muté) (Taly et al., 2012) pourrait permettre d'augmenter de façon importante la sensibilité. Le séquençage haut débit (NGS) quant à lui permet de rechercher des mutations sur des dizaines de locus en parallèle avec une limite de détection acceptable de l'ordre de 0.1% (Murtaza et al., 2013) (Cai et al., 2015).

4 / PCR digitale : technologie RainDance™

Au laboratoire, nous utilisons la technologie de PCR digitale de la société RainDance™ Technologies.

La PCR digitale en émulsion permet la détection très sensible de mutations rares au sein d'un mélange d'ADN complexe. Le principe repose sur une dilution limite de l'échantillon d'ADN dans des millions de compartiments, ou microgouttelettes aqueuses, dispersés dans de l'huile. L'échantillon est ainsi partitionné pour que chaque goutte contienne au plus une molécule d'ADN et les sondes de détection des mutations (TaqMan®, CastPCR™, etc.) ainsi que le mélange réactionnel nécessaire à la réaction de PCR.

Chacune des microgouttelettes est analysée individuellement pour détecter la présence ou l'absence d'une mutation spécifique grâce à la sonde de détection choisie à l'avance sur la base d'une connaissance préalable du profil moléculaire de la tumeur ou par choix arbitraire. Par exemple dans le cancer du poumon, on recherchera la mutation *EGFR* p.L858R dans un premier test, et la présence d'une délétion de l'exon 19 dans un second test.

Lors de l'analyse, une fluorescence est émise soit par la sonde mutée, soit par la sonde sauvage, chacune des deux sondes émettant à des longueurs d'ondes distinctes. Chaque compartiment ne peut alors qu'être positif ou négatif pour la séquence ciblée. Cette technique permet de quantifier avec précision le nombre de gouttes contenant un ADN muté ou un ADN sauvage, d'identifier les échantillons mutés (résultat qualitatif) et de quantifier avec précision le rapport allélique en cas de mutation (résultat quantitatif) (Pekin et al., 2011) (Zhong et al., 2011) (Didelot et al., 2013) (Figure 16).

Cette technique a été validée jusqu'à un seuil de détection de mutation de 0,0005% lorsque la quantité d'ADN de départ est suffisante. En effet une limite de détection d'une molécule mutée parmi 200 000 non mutées a été démontrée en utilisant de l'ADN génomique extrait d'une lignée cellulaire de cancer colorectal (Taly et al., 2013) (Pekin et al., 2011). Dans le cadre de l'analyse de l'ADNtc ce niveau de sensibilité ne peut pas être atteint car la quantité d'ADNtc présente dans le sang est faible (correspondant parfois à une quantité de génome inférieur à 1000).

La sensibilité du test en dPCR dépend du nombre de compartiments et de la quantité de molécules analysables, ainsi que du taux de faux-positifs inhérent à la technique utilisée (Taly et al., 2012). La distribution statistique de l'ADN dans les compartiments est donnée par la loi de Poisson, qui régit les statistiques d'évènements rares.

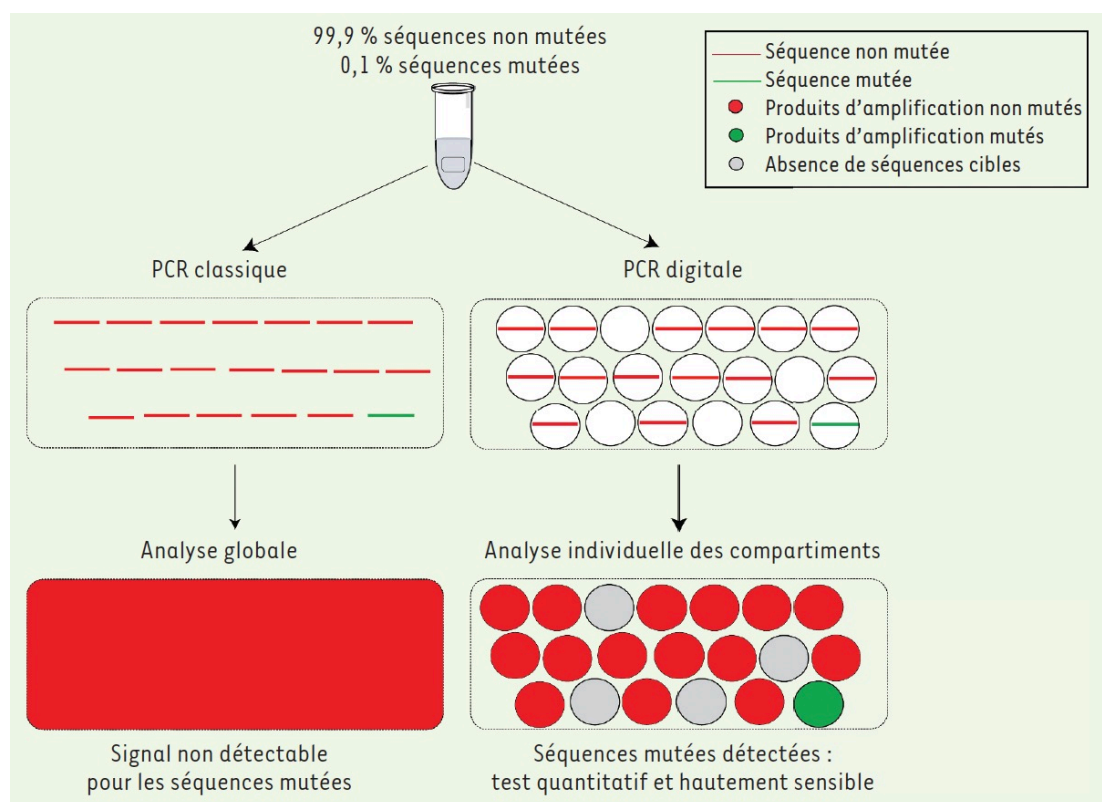


Figure 16 : Détection d'une séquence rare mutée en PCR classique et en PCR digitale.

Détection d'une séquence mutée (verte) au sein d'un mélange de séquence non mutée (rouge). La PCR classique amplifie un mélange complexe d'ADN, la détection de la séquence mutée est impossible car noyée dans les séquences non mutées. La PCR digitale amplifie indépendamment toutes les séquences d'ADN présentes dans le mélange, la détection de la séquence mutée est possible car chaque séquence est analysée individuellement (Perez-Toralla et al., 2015).

5 / Séquençage haut débit nouvelle génération : technologie Ion Proton™

Le séquençage de nouvelle génération (NGS) est une technologie très différente et complémentaire de la PCR digitale. L'avantage du NGS est de pouvoir analyser simultanément et sans a priori un grand nombre de gènes.

Cette technologie permet une analyse moléculaire précise des échantillons d'ADN tumoraux (Schmitt et al., 2012). C'est une technique à la fois qualitative et quantitative qui permet d'évaluer la présence de mutations et de quantifier la fraction d'allèle mutée. Son système de multiplexage permet d'amplifier simultanément différentes régions du génome prédéfinies par avance, sur plusieurs dizaines d'échantillons. Le développement de l'utilisation de cette technique, a permis de mettre sur le marché un large choix de panel commerciaux adaptés au typage des hotspots de mutations de différents types de cancer. La possibilité d'utiliser ces panels de gènes optimisés ou de créer des panels « à façon » est un des atouts de cette technologie.

On parle de NGS « ciblé » lorsque le séquençage est effectué sur un nombre défini de gènes. Actuellement, l'ADNtc est analysé de cette façon, elle garantit une sensibilité de détection suffisante, mais celle-ci est en théorie plus faible que la dPCR pour 1 mutation donnée. Cependant, des améliorations technologiques et d'analyse pourraient permettre d'augmenter la sensibilité du NGS.

Les plateformes de séquençage haut débit se développent sur les plateformes hospitalières et sont utilisées en routine de soin dans certains hôpitaux, notamment à l'Hôpital Européen Georges-Pompidou (HEGP) (Tsui and Berger, 2016a).

Dans le cadre de notre projet, nous avons utilisés un panel de gènes développé dans le cadre d'un consortium européen dont le laboratoire a fait partie. Il a été validé sur des échantillons tumoraux provenant de tissus congelés ou inclus en paraffine et provenant de divers cancers. L'objectif de ce panel est de répondre aux demandes de typage dans le cadre du soin, des échantillons d'adénocarcinomes bronchiques, coliques et de mélanomes (gènes *EGFR*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* entre autre) et de cibler les hotspots de mutations répertoriés dans les différents types de cancers qui peuvent ou pourront avoir un impact clinique dans le futur (*PIK3CA*, *AKT*, *ALK*, *TP53*, *STK11*). Ce panel : Ion AmpliSeq™ Colon-Lung Cancer Panel V2 (Life Technologies – Thermo Fisher Scientific), est dessiné pour séquencer simultanément 92 régions sur 22 gènes. L'utilisation d'un séquenceur de type Ion Proton™ permet le passage de 96 échantillons simultanément pour une profondeur de lecture supérieur à 1000X sur chaque amplicon.

Cette technique permet de répondre à la recherche de biomarqueurs demandés par l'INCa en une seule manipulation, à un coût plus faible et un rendu de résultat plus rapide que le séquençage gène par gène. Seulement 3-5 jours sont nécessaires pour préparer et séquencer 96 échantillons sur les 22 gènes du panel (*EGFR* – *AKT* – *BRAF* - *CTNNB1* - *ERBB2* - *ERBB4* - *FBXW7* - *FGFR1* - *FGFR2* - *KRAS* – *MET* - *NOTCH1* – *NRAS* - *PIK3CA* – *PTEN* - *SMAD4* - *STK11* - *TP53* – *ALK* - *DDR2* – *MAP2K*). L'analyse bioinformatique demandera encore 24-36 heures avant que les résultats soient disponibles.

Depuis quelques mois, des biopsies liquides sont également analysées avec cette même technique. Elle a l'avantage par rapport à la dPCR de pouvoir, à partir de la même quantité d'ADNlc de départ, d'analyser en parallèle un nombre de hotspots de mutation beaucoup plus large.

Exemple de validation de l'utilisation du NGS en routine de soin :

Validation sur du tissu FFPE – communication ESMO 2015

La comparaison des résultats de 1000 échantillons analysés dans le cadre du soin avec une technique classique de recherche de mutations (TaqMan® ou CastPCR™) pour un typage *EGFR*, avec l'utilisation du panel Ion AmpliSeq™ Colon-Lung Cancer Research Panel v2 (Life Technologies™ France), a permis de valider un gain de détection de 10% de mutations sur des variants rares d'*EGFR*, de *KRAS*, d'*HER2* et de *BRAF*, et d'identifier chez plus de 20% des patients des mutations que nous pourrions suivre dans le temps : *PIK3CA*, *NRAS*, *DDR2*, *STK11*, *MET*, *ALK*, *MAPK2*. Sur les 1000 échantillons testés, 93% étaient analysables en NGS, 7% étaient non interprétables soit par une absence d'amplification, une profondeur de lecture trop faible, ou un nombre de mutation anormalement élevé, enrichi en G>A ; C>T et qui suggère la présence d'artéfacts de fixation.

IV / LES PROBLEMATIQUES DU PROJET

Dans le cadre d'une étude prospective mono centrique observationnelle qui évalue l'impact de l'ADN tumoral circulant chez des patients atteints d'un cancer bronchique non à petite cellule, les objectifs de travail ont été d'évaluer :

- l'impact clinique de la détection de l'ADNtc en termes pronostic et prédictif de réponse au traitement
- l'impact clinique de la quantité d'ADNtc en termes pronostic et prédictif de réponse au traitement
- si la décroissance de l'ADNtc au cours du traitement est un facteur pronostic de survie globale
- si la présence d'ADNtc au début du traitement est un facteur pronostic de survie globale

Pour cela nous avons comparé et validé différentes méthodes d'extraction de l'ADNtc suivant des critères de rendement et de praticité. Nous avons évalué la faisabilité du typage de l'ADNtc par une technologie de séquençage haut débit nouvelle génération que nous avons validée par PCR digitale et nous avons mis au point une nouvelle technique d'analyse statistique des données générées par le NGS.

MATERIEL ET METHODES

I / Etude PlaPou

1 / Patients

L'étude PlaPou est une étude prospective mono centrique observationnelle qui évalue l'impact de l'ADN tumoral circulant chez des patients atteints d'un cancer bronchique non à petite cellule.

Cette recherche a été menée selon les recommandations formulées dans la Déclaration d'Helsinki. Les démarches réglementaires ont été réalisées auprès du Comité de Protection des Personnes Ile de France 2 (CPP Ile-de-France II n°2013-06-21 SC), et tous les patients ont signé un consentement éclairé. Le recrutement des patients a eu lieu à l'Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP) dans le service d'oncologie entre juin 2013 et novembre 2015. Les patients ont tous un CBNPC de stade avancé ou métastatique nouvellement diagnostiqué et ils débutent leur première ligne de traitement (124 patients).

Afin de supprimer un biais de sélection potentiel, tous les patients, quelle que soit l'altération de la tumeur, ont été inclus. Les critères de non inclusion étaient les suivants: antécédent de cancer diagnostiqué dans les 5 ans précédents, incapacité de se soumettre à un suivi médical, incapacité de lire ou de comprendre le formulaire de consentement.

2 / Recueil et conservation des échantillons biologiques

Tissu biologique : Il provient d'une chirurgie d'exérèse ou d'une biopsie. Il est conservé dans la paraffine, à température ambiante à l'HEGP.

Echantillon de plasma : Quatre tubes de sang EDTA sont collectés à l'inclusion du patient dans l'étude, avant l'initiation du traitement (chimiothérapie ou thérapie ciblée sous TKI) : échantillon référence ou « baseline » (T0). Quatre tubes sont prélevés à la première évaluation (6±2 semaines (E1)) et au moment de la progression de la tumeur selon les critères Recist 1.1 (ToP).

Cent neuf patients sont suivis via l'ADNtc à T0, 85 à E1 après leur première évaluation, 66 à ToP 13 n'ont pas de suivis, 7 ont eu leur première évaluation avant 1 mois ou après 2 mois, et 4 sont décédés durant le premier mois.

Les échantillons sanguins sont centrifugés à température ambiante à 2000G pendant 15 minutes dans les 2 heures suivant le prélèvement. Le plasma est immédiatement conservé à -25°C, et centrifugé une seconde fois dans les mêmes conditions juste avant l'extraction d'ADN.

3 / Suivi des données clinique

Les données ont été recueillies de façon prospective : le sexe, l'âge, le statut de performance (OMS), les antécédents de tabagisme, le type histologique de la tumeur et son stade, la description et le nombre de sites métastatiques, le traitement médical suivi, les dates à l'initiation et à la fin du traitement, l'évaluation radiologique effectuée tous les deux mois par CT-scan selon les critères RECIST 1.1, la date de la progression, la date du décès ou du dernier suivi.

II / Extraction ADN

Tous les ADN extraits sont conservés à -25°C.

1 / Extraction ADN de la tumeur

L'ADN des échantillons inclus en paraffine (FFPE) est extrait avec le kit QIAamp® DNA FFPE Kit, référence 56404, selon les recommandations du fournisseur (QIAGEN, Les Ulis, France). Elution dans 100µl de tampon d'élution.

2 / Extraction ADN du plasma

- Technique manuelle, technologie sur colonne avec une membrane à base de silice: QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit, référence 55114. Extraction selon les recommandations du fournisseur (QIAGEN, Les Ulis, France), à partir de 2 ou 3 mL de plasma, élution dans 50µl de tampon d'élution.
- Technique manuelle, technologie de bille paramagnétique : MagMAX™ Cell Free DNA Isolation Kit référence A29319. Protocole selon les recommandations du fournisseur (Life Technologies – Thermo Fisher Scientific), extraction à partir de 1mL de plasma, élution dans 50µl ou 15µl de tampon d'élution.
- Technique sur automate QIASymphony® SP de la société QIAGEN. Technologie de bille paramagnétique: kit DSP Virus Pathogen (QIAGEN, référence 937055), l'extraction se fait sur 2mL de plasma et élution dans 40µl de tampon AVE, selon les recommandations du fournisseur (QIAGEN, Les Ulis, France).
- Technique sur automate Maxwell® RSC de Promega. Technologie de purification sur bille paramagnétique : kit Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit, référence AS1480. Extraction sur 1 mL de plasma, élution dans 60µl de tampon TE, selon les recommandations du fournisseur (Promega, Charbonnières-les-Bains, France).

3 / Extraction ADN des lignées cellulaire

L'ADN des lignées cellulaires, contenant au moins 3 millions de cellules, est extrait avec le kit QIAamp® DNA Mini Kit référence 51306, selon les recommandations du fournisseur (QIAGEN, Les Ulis, France). L'élution se fait dans 200µl de tampon d'élution.

4 / Extraction ADN de la couche leucocytaire du prélèvement sanguin

L'ADN de buffy coat est extrait avec le kit QIAamp® DNA Mini Kit référence 51306, selon les recommandations du fournisseur (QIAGEN, Les Ulis, France). L'élution se fait dans 200µl de tampon d'élution.

III / Quantification de l'ADN

L'ADN est quantifié avec un Qubit® 2.0 fluorometer (Invitrogen™-ThermoFisher Scientific, Saint Aubin, France) et le kit Qubit® dsDNA HS Assay Kit référence Q32854 pour l'ADNlc et le kit Qubit® dsDNA BR Assay kit, référence Q32853 pour les ADN non issus de plasma.

IV / Fragmentation de l'ADN

L'ADN génomique et les ADN de lignée cellulaire contrôles, sont fragmentés avec un sonicateur S220 Focused-Ultrasonicator (Covaris, Woburn, MA) à une taille de 600-800 paires de base. La taille des fragments est vérifiée par LabChip® GX/GXII Microfluidic system avec le kit DNA Assay 5k reagent Kit (Perkin-Elmer, Villebon-sur-Yvette, France).

V / ADN contrôle

- ADN génomique non muté, (Promega, Charbonnières-les-Bains, France, référence G3041).
- Les lignées cellulaires servant de contrôle pour les tests en digitale PCR proviennent toutes de l'ATCC (Manassas, VA 20110, US).

- Les lignées avec une mutation *EGFR* : H1975 (p.T790M et p.L858R), H1650 (delE746-A750) ; avec une mutation *KRAS* A427 (p.G12D), H358 (p.G12C), SW620 (p.G12V), avec une mutation *BRAF* HT-29 (p.V600E).
- Pour valider la sonde *EGFR* p.L861Q, nous utilisons un ADN issu d'un échantillon de patient avec un cancer du poumon métastatique (Hôpital Européen George Pompidou, Paris, France).
- Pour valider la sonde *KRAS* p.G12R, nous utilisons un ADN issu d'une lignée cellulaire immortalisée (construction par mutagenèse dirigée (collaboration avec le Pr Pagès CHU de Tours)).
- Témoins ADN FFPE multiplex (muté *BRAF*, *KIT*, *EGFR*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*) référence HD-200, ADN génomique avec 10 mutations à une fréquence allélique de 5% (*BRAF*, *EGFR*, *FLT3*, *IDH1*, *JAK2*, *KRAS*, *MEK*, *NOTCH1*, *NRAS*, *PIK3CA*) référence HD-728, de la société Horizon Diagnostics™ - Royaume Uni)

Liste des ADN contrôle en Annexe 1.

VI / Digitale PCR : technique de PCR en microgouttelettes

Principe

Une molécule d'ADN est isolée dans une goutte dans laquelle se trouve l'ensemble des réactifs nécessaires à sa réplication. Chaque molécule d'ADN présente dans l'échantillon sera amplifiée de façon uniforme. La réplication de l'ADN sera représentative de l'échantillon de départ (respect des proportions sauvage / mutant). Dans chacune des gouttes, la réaction de PCR permet simultanément d'amplifier un fragment d'ADN, et d'amplifier le signal lumineux (fluorescence) émis par la dégradation de sondes TaqMan® spécifiques. S'en suit une lecture du signal lumineux de chacune des gouttes permettant de réaliser la détection et la quantification absolue du nombre de copies mutées. Le nombre de goutte donne la quantité amplifiable d'ADN cible. Les résultats sont présentés selon un diagramme en 2 dimensions où chaque point représente l'intensité fluorescente d'une goutte. Le nombre de goutte donne la quantité amplifiable d'ADN cible. Illustration du principe de la dPCR Figure 17.

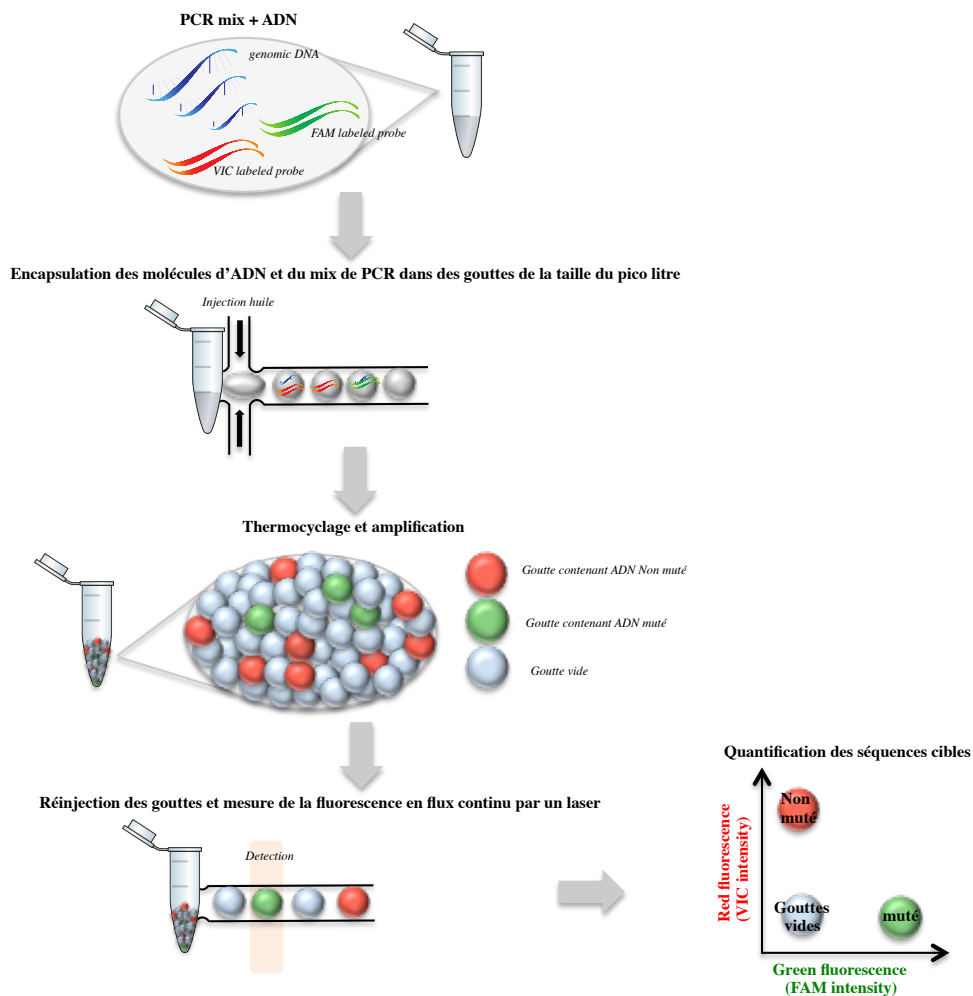


Figure 17 : Principe de la PCR digitale.

Préparation du mix de PCR (composition en Annexe 2), encapsulation du mix de PCR dans des gouttes, thermocyclage et amplification de l'ADN encapsulé, réinjection des gouttes et mesure de la fluorescence, quantification des séquences cibles (Zonta et al., 2016).

Dilution limite et loi de poisson

La sensibilité du test en dPCR dépend du nombre de compartiments et de la quantité de molécules analysables, ainsi que du taux de faux-positifs inhérent à la technique utilisée.

La distribution statistique de l'ADN dans les compartiments est donnée par la loi de Poisson, qui régit les statistiques d'évènements rares.

La loi de poisson dit que la probabilité $P(k)$ qu'un compartiment contienne une seule cible d'ADN peut être calculée avec la formule suivante :

$$P(k) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!}, (k \in \mathbb{N} \text{ et } \lambda > 0)$$

Où λ représente le nombre moyen de séquences d'ADN cible par compartiment (calculé à partir du nombre de copies d'ADN et le volume de l'échantillon de départ) et K le nombre de séquences d'ADN par compartiment. (Sciences de l'ingénieur, Nizard, 2015)

Pour n'avoir qu'une seule séquence d'ADN cible par compartiment, il faut que le nombre moyen de molécules par compartiment soit de 0,1 ($\lambda = 0.1$). Dans cette condition la probabilité d'avoir un nombre de compartiment contenant une molécule d'ADN est de 10%, la plupart des compartiments seront vides (90%). Si le nombre moyen de molécules par compartiment est multiplié par 10, ($\lambda = 1$) alors la probabilité de n'avoir qu'une séquence d'ADN cible par compartiment augmente (35%), mais dans le même temps plus de 20% des compartiments contiendront au moins deux séquences d'ADN cible. Ainsi pour augmenter la probabilité d'avoir des compartiments avec une seule séquence d'ADN cible il est nécessaire de se mettre dans des conditions de dilution limite de sorte que la probabilité d'avoir des compartiments vides est très grande. Dans ces conditions, pour avoir des données statistiques fiables, il est nécessaire d'analyser un très grand nombre de compartiments (représentation graphique Figure 18).

En multipliant le nombre de compartiments analysés, il est donc théoriquement possible de détecter et de quantifier de manière statistiquement fiable un faible nombre de séquences cible de l'ADN dans un grand nombre de séquences d'ADN de séquence proches. Donc de détecter une faible fraction d'ADN tumoral au sein d'un mélange complexe contenant également de l'ADN normal.

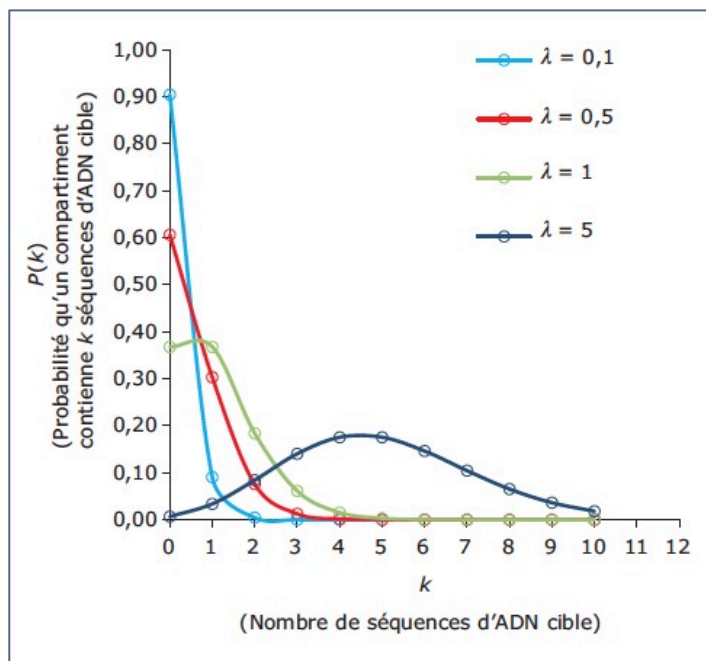


Figure 18 : Représentation de la distribution de Poisson en fonction du nombre de molécule dans un compartiment (λ).

La probabilité (P) qu'un compartiment contienne K séquences d'ADN cible pour différents nombres moyens de séquences cibles par compartiment (λ : bleu ciel 0,1 ; rouge 0,5 ; vert 1 et bleu 5).

Source : Sciences de l'ingénieur, Nizard, 2015

Digitale PCR : émulsion, thermocyclage et analyse

La liste des sondes et leurs références se trouvent en Annexe 3, les conditions de thermocyclage en Annexe 4.

Utilisation de sonde CastPCR™, TaqMan® (Life Technologies – Thermo Fisher Scientific) et Zen™ (Integrated DNA Technologies, Louvain, Belgique).

Les sondes TaqMan® spécifiques de l'ADN sauvage sont marquées avec un fluorophore VIC ($\lambda_{\text{ex}}538\text{nm}$ / $\lambda_{\text{em}}554\text{nm}$).

Les sondes TaqMan® spécifiques des mutations sont marquées avec un fluorophore FAM ($\lambda_{\text{ex}}494\text{nm}$ / $\lambda_{\text{em}}518\text{nm}$).

La sonde ZEN™ fonctionne sur l'hydrolyse de deux sondes, une sonde marquée avec un fluorophore TET ($\lambda_{\text{ex}}521\text{nm}$ / $\lambda_{\text{em}}536\text{nm}$) spécifique de l'allèle sauvage, et une sonde marquée avec un fluorophore FAM spécifique de l'allèle mutée (fournisseur IDT Integrated DNA Technologies). Les deux quenchers, un en début de séquence et un en fin de séquence vont limiter le bruit de fond. La fluorescence basale de la sonde avant hydrolyse est limitée et plus spécifique (Annexe 5).

Les sondes CastPCR™ : La différence entre la technique de CastPCR™ et les sondes TaqMan réside dans le fait que la spécificité de mutation est portée par l'amorce et non par la sonde émettrice. Les allèles non mutés sont marqués avec un fluorophore VIC, et les allèles mutés avec un fluorophore FAM. L'amorce témoin, non mutée (NM) se fixe au niveau d'un locus du gène différent de celui de la mutation ce qui permet l'utilisation d'un même témoin NM pour tous les mutations d'un même gène.

L'ADN est ajouté au mix (les primers et les sondes TaqMan sont mélangés avec l'ADNlc on y ajoute du Genotyping Master Mix, du stabilisateur pour maintenir la forme des gouttes (RainDance Technologies) (Annexe 2), 20ng pour les ADN contrôles, 3 à 6µl pour l'ADNlc, indépendamment de la concentration de l'échantillon. La réaction de PCR d'un volume final de 25µl contient de 300 à 800 copies d'ADN par µl pour les ADN contrôles.

L'appareil RainDrop® Source (RainDrop® Digital PCR System, RainDance Technologies, Billerica, US) permet de compartimenter le mix PCR de 25µl dans des gouttes de 5pL et génère entre 5 et 10 millions de gouttes. En utilisant des écoulements diphasiques (combinaison d'une phase aqueuse et d'une phase d'huile), les systèmes microfluidiques permettent de produire, à haute fréquence, des gouttes micrométriques mono dispersées. L'utilisation de tensioactifs stabilise les gouttes en évitant leur coalescence lorsqu'elles entrent en contact. Huit échantillons peuvent être compartimentés en parallèle. L'émulsion est récupérée dans une barrette de PCR (Axigen, VWR, Fontenay sous-bois, France). Les échantillons sont ensuite thermocyclés.

A la fin du cycle, les échantillons sont récupérés et l'émulsion est fermée avec des bouchons opaques (RainDance Technologies, Billerica, US) et transféré dans le RainDrop® Sense (RainDance Technologies, Billerica, US). Les lasers du Sens vont exciter et lire l'intensité de fluorescence émise par chacune des gouttes en FAM et en VIC/TET. Les données obtenues sont ensuite analysées avec le RainDrop Analyst data analysis software.

Validation des résultats

Pour valider les résultats de la dPCR il est nécessaire d'avoir validé au préalable les sondes de détection utilisées : TaqMan®, CastPCR™ et Zen. Il est indispensable de connaître le nombre de gouttes faussement positives détectées par la sonde ainsi que sa sensibilité. Pour cela, chaque sonde est testée en dPCR sur des dizaines d'échantillons non muté (ADN génomique). Les résultats sont incrémentés au fur et à mesure des tests (Figure 19).

Calcul de la limite de blanc (LOB) : la valeur obtenue est spécifique de la sonde testée, elle représente le nombre de gouttes mutées détectées dans un échantillon non muté. Pour un échantillon, cette valeur est soustraite du nombre de gouttes mutées et permet une quantification fiable du ratio allélique. (Milbury et al., 2014)

Calcul de la limite de détection (LOD) : la valeur obtenue est spécifique de la sonde testée, elle représente le nombre de goutte mutante minimum pour considérer qu'un résultat est positif. Ce calcul détermine la sensibilité de la sonde. Elle est calculée en fonction de la LOB (Milbury et al., 2014).

Exemple: 34 gouttes mutantes KRAS G12C détectées dans un échantillon d'ADNtc
Je soustrais une LOB de 3 (spécifique de la sonde KRAS G12C) : $34 - 3 = 31$
Je soustrais la LOB à une LOD de 7 (spécifique de la sonde KRAS G12C) : $7 - 3 = 4$
 $31 > 4$ LOD
Je peux interpréter mes résultats, mon échantillon est muté G12C

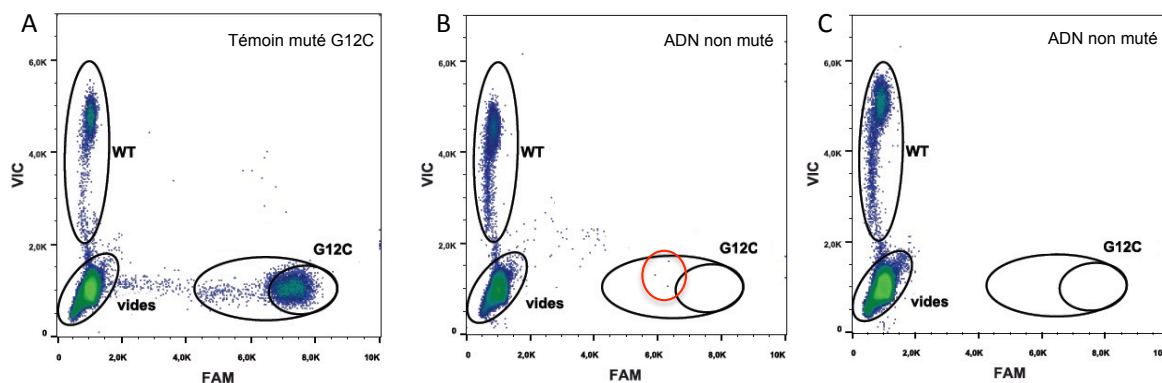


Figure 19 : Echantillons analysés en dPCR pour la détermination de la LOB et de la LOD de la sonde TaqMan KRAS G12C.

A : échantillon muté KRAS G12C, témoin positif. B : échantillon non muté KRAS G12C, présence de 3 gouttes mutées G12C, faux positif. C : échantillon non muté KRAS G12C, absence de goutte mutée, pas de faux positif.

Quantification de l'ADN tumoral circulant par digitale PCR

Pour toutes les analyses en dPCR, l'ensemble des gouttes FAM, VIC/TET est normalisé sur le nombre total de gouttes analysés (entre 5 et 10 millions), et le nombre de gouttes contenant de l'ADN muté est calculé après soustraction de la LOB et de la LOD.

La quantification absolue de l'ADN tumoral circulant est donnée en fonction du nombre de goutte sauvage, la fréquence allélique de la mutation et le volume d'élution de l'ADN, le tout normalisé pour 1mL de plasma.

VII / Séquençage nouvelle génération

La technologie Ion Proton™ est une méthode de séquençage haut débit nouvelle génération basée sur l'amplification de différentes régions de l'ADN à séquencer par technologie AmpliSeq™ (PCR multiplex), d'une amplification clonale sur billes et d'une étape de séquençage. Cette dernière étape est basée sur la détection de la libération d'un ion hydrogène lors de l'incorporation d'une base complémentaire en cours d'élongation. Chaque dNTP est présenté successivement. S'il y a incorporation, la libération d'un ou plusieurs H⁺ conduit à un signal mesurable correspondant à une variation de pH.

Chaque fragment amplifié génère une séquence. Elles sont ensuite alignées et comparées au génome humain de référence. Les variations par rapport à la référence sont détectées et quantifiées en termes de ratio allélique. Cette quantification se fait par comptage du nombre de séquences mutées pour une position définie du génome.

Dans le cadre de notre étude nous utilisons le panel Ion AmpliSeq™ Colon-Lung Cancer Panel V2 (Life Technologies – Thermo Fisher Scientific). Ce panel est dessiné pour séquencer simultanément jusqu'à 96 échantillons sur 22 gènes soit 92 régions susceptibles de contenir des mutations retrouvées fréquemment dans le cas de cancer pulmonaire et de cancer colorectal.

Les librairies pour le séquençage sont préparées à partir de l'ADNlc avec le kit Ion AmpliSeq™ Colon and Lung Cancer Research Panel V2 (Life Technologies – Thermo Fisher Scientific), selon les recommandations du fournisseur. Les multiplex contenant les librairies barcodées sont générées avec le kit Ion AmpliSeq™ Library kit v2 (4480442) à partir de 6µl d'ADNlc (médiane à 7.44ng (1.1-300ng)). Les librairies sont ensuite normalisées à 100pmol avec le kit Ion Library Equalizer (4482298). Le pool de librairies (jusqu'à 96 échantillons) est ensuite pris en charge par un automate « Ion Chef™ System » qui assure la PCR digitale sur sphères et le chargement de la puce à l'aide du kit Ion PI Hi-Q Chef Kit (A27198). Le séquençage proprement dit est effectué sur l'Ion Proton™ System avec le kit Ion PI Chip Kit v3 (A26771).

Un schéma de principe du Ion Proton™ se trouve en Annexe 6.

Notions essentielles

La couverture : c'est l'étendue du séquençage correspondant globalement au nombre de gènes ou exons testés ayant un niveau de lecture suffisant. C'est le nombre total de bases séquencées ou encore l'étendue horizontale du typage.

Certaines régions sont difficiles à séquencer (mal couverte), il est important de les connaître afin de limiter les erreurs d'interprétation.

La profondeur : c'est le nombre de fois ou un même fragment d'ADN (amplicon) est lu. C'est l'étendue verticale.

La profondeur permet d'estimer le rapport allélique, c'est-à-dire le nombre d'allèles mutés par rapport au nombre d'allèles sauvages. A titre d'exemple : un amplicon séquencé 1000 fois (1000X), comportant 200 séquences mutées et 800 séquences non mutées, le rapport mutée/non mutée est estimé à 20%. Cette variable conditionne la sensibilité de l'analyse. En effet si la profondeur de lecture est faible, la sensibilité de détection le sera aussi. Une base retrouvée mutée 3 fois et lue 30X fois n'a pas le même poids qu'une base retrouvée mutée 300 et lue 3000 fois.

Il est possible d'atteindre des profondeurs supérieures à 5000X par amplicon dans le cas de séquençage ciblé. Cela permet l'analyse des populations sous clonales peu représentées ainsi que l'analyse de l'ADN tumoral circulant avec une sensibilité inférieure à 1%.

Capacité de séquençage : elle est définie par le nombre de bases analysables sur une puce de séquençage. Le volume de séquence est calculé en comptabilisant le nombre d'échantillons, la couverture et la profondeur souhaitée.

Analyse des données

Les données brutes de séquençage obtenues sont ensuite alignées sur le génome humain de référence : Human Genome version 19 (hg19) avec le logiciel Ion Torrent Suite V4.2.1. Les résultats sont générés sous forme de fichier BAM (binary alignment). Ceux-ci vont être calibrés avec un second logiciel « GATK ». Tous les sites de polymorphisme, les insertions et les délétions vont se positionner. Puis nous appliquons la matrice d'analyse mis au point au laboratoire qui consiste à analyser les données selon la méthode du Base Position Error Rate (BPER), qui permet de détecter les mutations au sein des échantillons en suivant un test binomial qui va comparer chaque position de base A, T, G, C, insertion, délétion. Parmi toutes les positions de base testées dans un échantillon, on appelle mutation les positions les plus significativement différentes du bruit de fond grâce à la technique de détection des valeurs aberrantes, la technique « outlier detection methods » (voir la partie résultat, Pécuchet et al 2016 clin biochem).

Il n'y a pas de méthode définie d'analyse et de validation des résultats. Chaque utilisateur doit mettre en place un algorithme d'analyse bio-informatique adapté à son utilisation. Cette étape est primordiale dans la validation des résultats, car il est important de limiter les faux négatifs par manque de sensibilité ou par défaut de couverture et les faux positifs par sur-interprétation du bruit de fond mutationnel.

Dans la suite de ce rapport nous expliquerons la méthode qui nous a permis d'interpréter et de valider les résultats de séquences de notre cohorte d'ADN tumoral circulant.

Positions Hotspot étudiées

Hotspot de variation de nucléotide simple (SNV) : *KRAS* and *NRAS* codons 12, 13, 61, 117, 146; *BRAF* codon 600; *EGFR* codons 790, 858, and 861; *PIK3CA* codons 542, 545, 1047; *AKT1* codon 17; *MAP2K1* codon 57.

Hotspot des insertions et des délétions (INDEL) : *EGFR* exon 19 and exon 20.

VIII / Analyse statistique

La date butoir pour l'analyse était de mai 2016, et les patients ont été censurés au dernier suivi.

Les analyses de survies ont été calculées à l'aide de la méthode d'estimation de Kaplan-Meier. La survie globale a été calculée à partir de la date de début du traitement jusqu'au décès toute cause confondue. La survie sans progression a été calculée à partir de la date de début du traitement jusqu'à la progression radiologique selon les critères RECIST ou le décès du patient.

Le modèle de régression de Cox (modèle à risque proportionnel) est utilisé pour les analyses univariées et multivariées avec un intervalle de confiance de 95.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel JMP version 10.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Une p-value <0.05 est considérée comme significative.

RESULTATS

I / Les techniques d'extraction de l'ADN libre circulant

1 / Extraction ADN libre circulant

La prise en charge des patients atteints d'un cancer au stade métastatique passe aujourd'hui par une caractérisation des altérations somatiques tumorales à la recherche d'une cible thérapeutique potentielle.

L'isolement et l'analyse de l'ADN tumoral circulant issu de plasma est susceptible d'être utilisé comme approche non invasive pour détecter ces altérations. Mais les résultats analytiques sont très dépendants de l'étape d'extraction qui doit permettre d'isoler efficacement des quantités souvent faibles de matériel et être compatible avec les techniques mises en place en aval.

Ces méthodes d'extraction doivent également pouvoir être mises en place facilement à l'hôpital dans le cadre du soin courant.

2 / Différentes méthodes d'extraction

2-1 - Technologie : colonne avec membrane de silice

La technologie d'extraction sur colonne avec membrane de silice est une méthode largement répandue dans les kits d'extraction de laboratoire. L'ADN est adsorbé spécifiquement sur la membrane de silice en présence de certains sels et à un pH particulier. Les contaminants cellulaires sont éliminés par les différentes étapes de lavage. Des sels chaotropes sont inclus pour aider à la dénaturation de protéines et à l'extraction de l'ADN. L'ADN est finalement élué dans un tampon faible en sel ou tampon d'élution.

Depuis quelques années, nous utilisons au laboratoire le kit de la société Qiagen : QIAamp® Circulating Nucleic Acid kit, qui fonctionne sur ce principe. Il permet de récupérer des acides nucléiques fragmentés présents dans un volume de plasma allant de 1 à 5mL. Il faut 4 heures pour extraire 24 échantillons. Il est devenu notre kit de référence. C'est aussi le kit le plus référencé dans les publications concernant l'ADNtc.

2-2 - Technologie : séparation bille magnétique

La technologie d'extraction sur billes magnétique est une méthode basée sur la liaison réversible de l'ADN à une surface solide, des billes paramagnétiques recouvertes d'une couche de silice. Après liaison spécifique de l'ADN, les billes sont séparées des autres composants cellulaires contaminants, lavées et finalement l'ADN purifié est élué.

Les billes magnétiques lient l'ADN de manière plus efficace que les membranes de silice, ce qui entraîne des rendements supérieurs et plus uniformes. En outre, il n'y a pas de risque de colmatage de la membrane au cours du processus d'extraction. Ce problème de colmatage est particulièrement préoccupant avec des échantillons riches en protéines de grand volume tels que le plasma.

Les automates QIAasympy® SP de la société Qiagen et Maxwell® RSC de la société Promega fonctionnent sur ce principe, de même que le kit manuel MagMAX™.

2-2-1 – QIAasympy® SP : DSP Virus Pathogen

Qiagen a adapté son protocole manuel pour le mettre en place sur l'automate QIAasympy® SP.

A la différence du kit manuel, la capture des ADNlc ne se fait pas sur une membrane à base de silice mais sur des particules magnétiques à base de silice. Le pH des tampons de lavage et d'éluion font que l'ADN reste fixé ou non aux billes.

Comme pour le kit manuel, le protocole comporte 4 étapes : une lyse, un accrochage de l'ADN sur les billes, des lavages et une éluion (Figure 20). Il peut traiter 24 échantillons en parallèle. De même, l'utilisation d'un RNA carrier est fortement recommandée si on veut optimiser la récupération des acides nucléiques. Une extraction complète dure 3h00.

Le protocole est optimisé pour des grands volumes de plasma de l'ordre de 4mL avec une éluion dans 70µL de tampon. Mais dans le cadre de notre étude nous avons décidé de tester ce kit dans les mêmes conditions que celles utilisées avec la technique manuelle Qiagen, c'est à dire à partir de 2mL de plasma et une éluion dans 40µL de tampon.

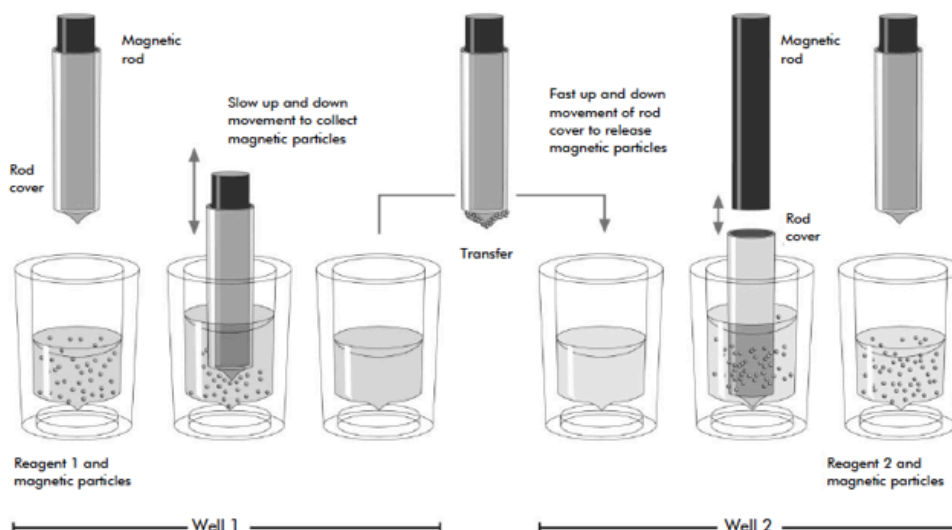


Figure 20 : Principe de fonctionnement du QIA Symphony® SP.

Un barreau magnétique (rod), recouvert d'une protection plastique (rod cover) plonge dans un puits avec des billes magnétiques, puis dans celui avec l'échantillon. S'en suit des étapes de lavage. Le barreau aimanté sur lequel les billes et l'ADN est accroché va plonger dans différents puits contenant des tampons de lavage. La dernière étape consiste à lâcher les billes dans le tampon d'élution, l'ADN va se décrocher et les billes vont être récupérées et jetées.

2-2-2 - Maxwell® RSC : ccfDNA Plasma

En 2015, la société Promega nous a proposé de tester avant commercialisation un nouveau kit d'extraction disponible sur leur automate Maxwell® RSC : le ccfDNA Plasma Kit. Il a pour objectif de récupérer l'ADNlc à partir d'un volume de plasma très faible : de 0,2 à 1mL. Le principe de ce kit repose sur une technologie de bille paramagnétique.

L'avantage de cet automate est sa simplicité d'utilisation. Une extraction permet de traiter 16 échantillons en 80 minutes, de plus il ne pipette aucun liquide, les barreaux aimantés se déplacent toujours au-dessus du même échantillon donc le risque de contamination inter-échantillons est très faible.

Nous avons testé ce kit sur 1mL de plasma, l'objectif étant d'avoir un meilleur rendement que le kit Qiagen manuel mais en utilisant un volume de plasma moins important et en automatisant l'extraction.

2-2-3 – Life Technologies : MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation Kit

Courant 2016, la société Life technologies nous a proposé de tester avant commercialisation leur nouveau kit d'extraction destiné à la récupération de l'ADNlc à partir d'une faible quantité de plasma. Le MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation Kit est optimisé pour les échantillons biologiques. C'est une technique d'extraction manuelle, mais l'accroche de l'ADNlc se fait sur des billes

paramagnétiques avec une chimie de surface à base de silice (Dynabeads MyOne Silane) et non sur des colonnes avec membrane.

Cette technique a l'avantage de pouvoir adapter le protocole en fonction du tube de prélèvement sanguin utilisé (EDTA ou Cell-Free DNA BCT® développé par la société Streck), de pouvoir choisir le volume de plasma à extraire ainsi que le volume d'élution, qui peut descendre jusqu'à 15µl.

Il existe deux protocoles différents pour ce kit, un protocole manuel standard avec une élution dans 50µl et un protocole dédié pour une utilisation en NGS de l'ADNlc, permettant de concentrer les ADNlc dans un volume d'élution plus faible de 15µl.

Le but de ce test est de maximiser la récupération de l'ADNlc à partir d'un volume de plasma faible et d'optimiser l'analyse en NGS grâce au protocole dédié.

3 / Comparaison de méthode et analyses

3-1 - Test du kit MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation

Nous avons testé le kit MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation, sur une série de 10 échantillons de plasma de patient avec un cancer du poumon non à petite cellule.

Ces échantillons avaient tous été extraits une première fois avec le kit manuel Qiagen, analysés en dPCR (Figure 21) et séquencés sur l'Ion Proton™. Ils sont tous mutés *EGFR*, avec une fréquence allélique du mutant allant de 0,4% à 28% (Tableau 4).

Les données présentées correspondent à une sélection de 3 échantillons parmi les 10 analysés : l'échantillon 42 PL 1, l'échantillon 48 PL 1 et l'échantillon 35 PL 7.

La Figure 21 est une représentation graphique des résultats obtenus en dPCR des 3 échantillons extraient manuellement. Le tableau 5, regroupe les données de fréquence allélique du mutant analysé en dPCR et en NGS. Les valeurs sont très proches et valident la présence d'ADNlc analysable au sein d'ADNlc chez des échantillons extraits avec la technique manuelle Qiagen.

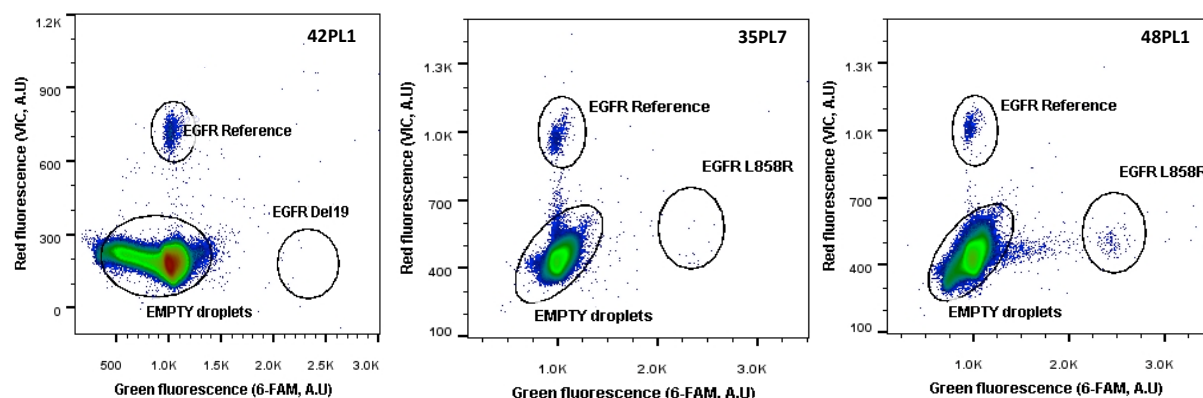


Figure 21 : Représentation graphique de la dPCR des échantillons 42PL1, 35PL7 et 48PL1.

dPCR sur les échantillons extraient avec le kit QIAamp® nucleic acid. L'échantillon 42PL1 est muté Del19 avec une fréquence allélique du mutant de 0,46%, l'échantillon 35PL7 est muté p.L858R avec une fréquence allélique du mutant de 2,21%, et l'échantillon 48PL1 est muté p.L858R avec une fréquence allélique du mutant de 28,21%.

échantillon	mutation	fréquence allélique du mutant - NGS - méthode extraction manuelle Qiagen	fréquence allélique du mutant - dPCR - méthode extraction manuelle Qiagen
42 PL 1	EGFR délétion exon 19	0,39%	0,46%
35 PL 7	EGFR mutation p.L858R	1,71%	2,21%
48 PL 1	EGFR mutation p.L858R	27,07%	28,21%

Tableau 5 : Comparaison des fréquences alléliques de 3 échantillons obtenues en NGS et en dPCR.

Comparaison de 3 des 10 échantillons extraient avec le kit QIAamp® nucleic acid. Fréquence allélique du mutant en NGS et en dPCR

Pour notre test, les 10 échantillons sont extraient à partir de 1mL de plasma, une première fois suivant le protocole « isolate cfDNA manuellement » et une seconde fois suivant le protocole « high concentration ». Ils sont ensuite dosés et séquencés sur l'Ion Proton™ avec le panel Colon-Lung.

Le dosage au Qubit® montre que la quantité d'ADNlc extraite mesurée au Qubit® et rapportée au 1ml de plasma extrait montre une diminution de moitié de la quantité d'ADNlc obtenue lorsque le plasma est extrait avec le kit MagMAX™ « isolate cfDNA manuellement » en comparaison avec le kit manuel QIAamp® nucleic acid (Tableau 6).

Les échantillons extraient avec la technique « high concentration » dédiée pour l'analyse en NGS ne sont pas suffisamment concentrés pour être dosés au Qubit.

Dans le cas du Séquençage NGS, le volume de séquence obtenu avec les échantillons extraient avec le kit MagMAX™ est 4 fois inférieur à celui des échantillons extraient avec la technique de référence

(Tableau 7). Moins de 10% d'amplicons s'alignent sur le génome de référence, contrairement à un échantillon extrait avec le kit manuel Qiagen ou plus de 90% des amplicons séquencés s'alignent. Il pourrait s'agir d'une amplification non spécifique dans le cas de l'ADN extrait en MagMAX™. Le nombre de fois ou un amplicon est lu est inférieur à 250 dans le cas de notre test, il est de plus de 10 000 fois pour un échantillon classique.

Nous en avons conclu que le séquençage des 10 échantillons n'était pas interprétable, et au vu de ces résultats nous avons décidé de ne pas aller plus loin dans le test de ce kit.

échantillon	mutation	concentration ADNlc en ng/mL - méthode extraction manuelle Qiagen	concentration ADNlc en ng/mL méthode extraction MagMAX™ « isolate cfDNA manually »
42 PL 1	EGFR délétion exon 19	101	37,25
35 PL 7	EGFR mutation p.L858R	15,57	13,8
48 PL 1	EGFR mutation p.L858R	71,2	23,85

Tableau 6 : Dosage de 3 échantillons extraits manuellement ou avec le kit MagMAX™.

Code à barre	identifiant	nombre totale de séquence lue	pourcentage de séquence alignée sur le génome	moyenne du nombre de fois ou un amplicon est lu
lonXpress_074	42PL1	314549	7.71%	245.5
lonXpress_076	35PL7	10667	3.70%	3.609
lonXpress_075	48PL1	309683	4.61%	142.5
lonXpress_084	42PL1	779103	0.01%	0.777
lonXpress_086	35PL7	299566	0.06%	1.330
lonXpress_085	48PL1	264387	0.04%	0.931
lonXpress_094	94	1165982	91.73%	10668

Tableau 7 : Résultat de séquençage de 6 échantillons extraits avec le kit MagMAX et un échantillon témoin.

Lignes vertes : échantillons extraient avec le kit MagMAX™ protocole « isolate cfDNA manually ». Lignes rouges : échantillons extraient avec le kit MagMAX™ protocole « high concentration ». Ligne blanche : échantillon témoin extrait avec le kit QIAamp® nucleic acid. Tous les échantillons ont été séquencés sur la même puce.

3-2 - Comparaison des techniques Qiagen / Promega

Nous avons testé le kit ccfDNA Plasma Kit - Maxwell® RSC sur une série de 46 échantillons de plasma de patient avec un cancer du côlon métastatique.

Tous les plasmas avaient déjà été extraits une première fois avec le kit manuel Qiagen ou avec le kit DSP virus pathogen sur l'automate QIAasympy® SP. Cette première série d'extraction a été analysée en dPCR, toutes les tumeurs des patients sont mutées sur le gène *KRAS*, l'analyse de leur ADNlc montre une fréquence allélique du mutant variable allant de 0 à 212%. Certains échantillons ont une fréquence allélique du mutant supérieur à 100%, ceci est dû à un nombre de goutte mutantes supérieur au nombre de gouttes non mutantes au sein de l'échantillon. Certains échantillons ont une quantité d'ADNtc supérieur à la quantité d'ADNlc.

Pour notre test, nous avons extrait avec le kit ccfDNA Plasma Kit les 46 échantillons. Puis nous avons rapporté la quantité d'ADNlc mesuré au Qubit® au 1ml de plasma extrait. Les résultats en technique Maxwell® RSC montre une équivalence ou une supériorité par rapport à la technique manuelle sauf pour 5 échantillons.

Les échantillons ont ensuite été analysés en dPCR. Les rendements d'extraction mesurés sont tous supérieurs pour les échantillons extraits avec le Maxwell® RSC (Tableau 8). De plus, l'extraction automatisée sur le Maxwell® RSC permet de détecter la mutation recherchée dans 45,7% des échantillons. En comparaison, la méthode d'extraction de référence permet de détecter cette mutation pour 36,9% des mêmes échantillons (Figure 22 et Tableau 9).

On note 3 discordances : 2 échantillons mutés en méthode Maxwell® RSC retrouvés non muté en technique manuelle et un échantillon non muté en méthode Maxwell® RSC retrouvé muté en technique manuelle.

Les résultats montrent donc une bonne cohérence des deux méthodes d'extraction.

Aucun échec d'amplification n'a été constaté avec les échantillons extraits avec le Maxwell® RSC tandis que 4 échantillons n'ont pas permis d'obtenir d'amplification avec la méthode de référence.

Les données présentées correspondent à une sélection de 2 échantillons parmi les 46 analysés.

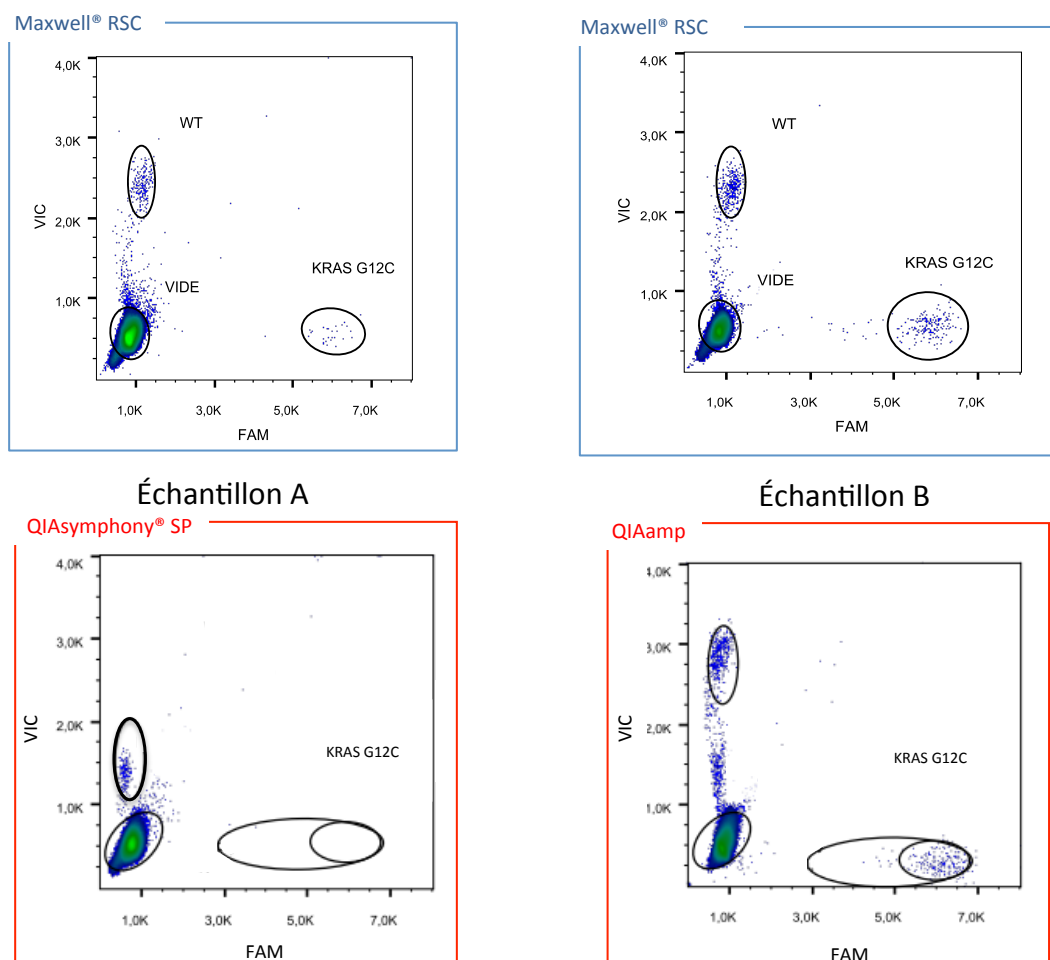


Figure 22 : dPCR de deux échantillons extraient avec une technique Qiagen ou la technique Maxwell® RSC.

Echantillon A : Extrait une première fois avec le QIAasympy® SP, kit DSP Virus Pathogen, en rouge. Et une seconde fois avec l'automate Maxwell® RSC, kit ccfdNA Plasma, en bleu. Echantillon B : Extrait une première fois avec le kit manuel QIAamp® nucleic acid, en rouge. Et une seconde fois avec l'automate Maxwell® RSC, kit ccfdNA Plasma, en bleu.

Analyse en dPCR de l'ADNtc. Les gouttes mutées KRAS G12C sont en bas à droite (coordonnée (1 ;0)), en haut à gauche les gouttes non mutées (coordonnée (0 ;1)), en coordonnée (0 ;0) les gouttes vides.

Echantillon A	QIAasymphony® SP	Maxwell® RSC
Condition extraction	2 ml – 40µl	1 ml – 60µl
Nb. Gouttes NM	212	206
Nb. Gouttes M	0	26
% Mutant	0 %	12,6 %
C. ng/ml plasma extrait ADNlc	2,3	9,1
Échantillon muté oui/non	NON	OUI

Rendement 4 fois supérieur

Echantillon B	QIAamp® nucleic acid	Maxwell® RSC
Condition extraction	2 ml – 50µl	1 ml – 60µl
Nb. Gouttes NM	500	335
Nb. Gouttes M	201	174
% Mutant	40 %	52 %
C. ng/ml plasma extrait ADNlc	10,8	20,0
Échantillon muté oui/non	OUI	OUI

Rendement 1,9 fois supérieur

Tableau 8 : Détails des échantillons A et B.

Information sur les conditions d'extraction, le nombre de gouttes mutées M, le nombre de gouttes non mutées NM, la fréquence allélique du mutant, la concentration d'ADNlc en ng/mL, la conclusion sur le statut mutationnel de l'échantillon et le rendement de la technique d'extraction du Maxwell® RSC par rapport à une technique d'extraction Qiagen manuelle ou avec le QIAasymphony® SP.

	n	Mutation -	Mutation +	Non interprétable
Méthode de référence du laboratoire	46	25 (54,3%)	17 (36,9%)	4 (8,7%)
Promega Maxwell® RSC ccDNA Plasma kit		25 (54,3%)	21 (45,7%)	0

Tableau 9 : Taux de mutation détecté en dPCR avec la méthode manuelle Qiagen et le kit ccDNA plasma de Promega.

Bilan des 46 échantillons testés. 25 échantillons négatifs en dPCR pour les deux techniques d'extraction, 21 échantillons retrouvés mutés avec le kit Promega contre 17 pour le kit Qiagen. 4 échantillons non interprétable avec le kit Qiagen contre 0 pour le kit Promega.

3-3 - Conclusions

Conclusions MagMAX™ : Les quantités d'ADNlc obtenues sont plus faibles que celles obtenues lors d'une extraction avec le kit de référence. Mais le problème majeur est l'impossibilité d'interprétation des données de séquençage.

Conclusions QIAasymphony® SP : Les quantités d'ADNlc obtenues sont sensiblement les mêmes qu'avec la technique manuelle mais les échantillons contiennent moins d'ADN amplifiable. De plus, le tampon d'élution contient du sel, mauvais pour la PCR digitale, ce qui pourrait expliquer les problèmes d'amplification observés.

Conclusions technique manuelle Qiagen : La quantité d'ADNlc récupérée est suffisante pour être dosée, et les fragments d'ADN sont amplifiables. La concentration d'ADNlc varie entre 1-1000 ng/mL de plasma extrait avec une moyenne à 50 ng/mL. La variabilité des concentrations obtenue témoigne de la variabilité « vraie » de concentration en ADNlc des plasmas et non d'un problème technique aléatoire. En effet quelques échantillons ont été extraits 2 fois et il existe une bonne corrélation entre les aliquots d'un 1 même prélèvement. Cette méthode a plusieurs avantages, il est possible de traiter 24 échantillons en parallèle et les volumes de plasma et d'élution sont adaptables au cas par cas. Par contre la durée de l'extraction et la praticité du kit font qu'il est difficile d'envisager un passage en routine hospitalière : il faut en moyenne 4 heures pour réaliser une extraction de 24 plasmas.

Conclusions Maxwell® RSC : L'ADNlc extrait à partir de 1ml de plasma permet d'obtenir de bons résultats de typage dans la série de plasma test par comparaison à la méthode manuelle qui nous sert de référence. Au total, les performances, la facilité d'utilisation du kit ccfDNA Plasma et la semi-automatisation de la méthode sont des points importants dans le cadre de la mise en place de ces tests en pratique de soin.

Depuis ces tests, le service de biochimie de l'HEGP a mis en place l'extraction de plasma sur le Maxwell® RSC en routine de soin.

Les échantillons de plasma des projets en cours vont continuer à être extraits avec la technique de référence du laboratoire tandis que les nouveaux projets concernant l'ADN tumoral circulant seront menés avec le kit ccf DNA plasma.

Le typage sur de l'ADNlc extrait à partir de 1mL de plasma peut être néanmoins limitant pour les prélèvements peu concentrés. L'optimisation du système sur un volume plasmatique de départ plus important apporterait un plus pour ces échantillons limites. Nous devons prochainement tester avant commercialisation le kit ccfDNA Plasma de Promega destiné à l'extraction de 2 à 4mL de plasma.

II / Mise au point d'une technique de validation de résultat de séquençage haut débit : Base Position Error Rate

L'utilisation clinique de l'ADN tumoral circulant pour caractériser les altérations génétiques de la tumeur exige de nouvelles méthodes basées sur le séquençage nouvelle génération. Seulement la détection des variations de nucléotides simples (SNV) et les insertions / délétions (INDEL) dans l'ADNtc est difficile en raison de leur faible fréquence allélique. Les mutations sont plus ou moins cachées dans le bruit de fond, il est difficile de déterminer s'il s'agit d'une vraie mutation, d'un faux positif ou d'une erreur de séquençage.

L'intérêt du NGS est sa capacité à identifier sans a priori des mutations au sein d'un panel de gènes. La taille du panel doit permettre, en adéquation avec la capacité du séquenceur d'analyser les échantillons avec une profondeur de lecture d'au moins 5000X pour pouvoir atteindre une sensibilité inférieure à 1% soit ici 50 séquences mutées sur 5000 séquences lues. Néanmoins, le plus grand challenge était de développer un système de détection des mutations (« caller ») pour identifier les variants rares inférieur à 1% car les programmes d'analyses de résultat standard ne sont pas adaptés pour atteindre le seuil de détection nécessaire pour l'analyse de l'ADNtc. C'est pourquoi, il est classique d'entendre que le NGS ciblé manque de sensibilité par rapport à la dPCR. Au final, la sensibilité de séquençage est limitée par plusieurs points : la profondeur de séquençage, le bruit de fond (qui existe aussi en dPCR : spécificité des sondes), et la méthodologie d'analyse pour détecter les mutations.

Dans les 2 situations, la sensibilité est dépendante de l'échantillon. Si le plasma ne contient que très peu d'ADN, aucune méthode ne garantira une sensibilité inférieure à 1%.

En utilisant une approche classique d'utilisation du NGS avec le panel Ion AmpliSeq™ Colon-Lung Panel V2, nous avons développé une méthode statistique pour détecter des mutations présentes dans l'ADNtc sans une connaissance préalable des altérations tumorales.

Cette méthode d'analyse est basée sur la quantification du nombre d'erreur retrouvé sur chacune des bases séquencées (BPER – Base Position Error Rate) dans un ensemble de contrôles négatifs. Pour identifier la mutation, un test binomial est utilisé pour comparer la fréquence de l'allèle mineure mesurée à chaque position de base de la série contrôle. Ce procédé a été validé sur une série d'échantillon témoin et une série d'échantillons de plasma de patients atteints d'un cancer du poumon.

1 / Nouvelle approche d'analyse des résultats obtenus par NGS

Les échantillons d'ADN sont préparés pour le séquençage avec le panel Ion AmpliSeq™ colon lung cancer research panel V2, puis analysés sur l'Ion Proton™.

Le logiciel « Ion Torrent Suite » aligne les séquences sur le génome de référence : Human Genome version 19 (hg19) et génère les résultats sous forme de fichier BAM (binary alignment). Ceux-ci vont être calibrés avec un second logiciel « GATK ». Tous les sites de polymorphisme, les insertions et les délétions vont se positionner.

1-1 - Optimisation des séquences

Pour tous les échantillons analysés, les amplicons sont rognés de 8 bases en 3' et 5' (extrémités très bruitées), les sites de polymorphisme nucléotidique connus SNP (single-nucleotide polymorphism) sont exclus (115 sites avec une fréquence allélique >0,01%), ainsi que les bases avec un score de qualité faible.

1-2 - Calcul du bruit de fond

Nous avons effectué un comptage des nucléotides (A, T, C, G), des insertions / délétions (>2 nucléotides), sur chaque brin (brins sens ou anti sens)- Cette étape est répétée pour chaque position génomique typée dans notre panel de gènes.

- La profondeur (N0) est calculée en faisant la somme des A, T, G, C. présent sur une position nucléotidique.
- A chaque position, un allèle majeur et un allèle mineur est défini. L'allèle majeur est celui ayant le plus grand nombre de nucléotide identique, c'est la somme du nucléotide le plus représenté. L'allèle mineur est celui avec le plus grand nombre de nucléotide identique après celui de l'allèle majeur.
- Le bruit de fond est calculé pour chacune des positions:
 - Le bruit de fond des SNV correspond à la profondeur moins l'allèle majeur à chaque position (E0-SNV)
 - Le bruit de fond des INDEL correspond à la somme des insertions et des délétions à chaque position (E0-INDEL)

1-3 - Taux d'erreur

Le bruit de fond de chaque position (E0-SNV) est calculé individuellement pour chaque échantillon témoin. Puis les bruits de fond de chaque position de tous les échantillons sont additionnés. Le même calcul est réalisé pour les E0-INDEL et pour la profondeur (N0).

Le calcul du taux d'erreur pour chaque position (p0-SNV ou p0-INDEL) se fait en divisant E0-SNV ou E0-INDEL par la profondeur N0 calculé précédemment.

Par exemple : profondeur = 50, allèle majeur = 45, profondeur totale = 50

taux d'erreur pour cette position de base p0-SNV = 0,1

1-4 - Filtre par biais de brins

Répartition des brins positif et négatif à chaque position de base.

Pour chaque plasma testé, nous avons appliqué un filtre individuel de position de base en supprimant la position quand le biais de brin de l'allèle de référence est en dehors de l'intervalle 0,1-0,9 (somme des nucléotides majeur sur le brin positif / somme des nucléotides majeur à cette position). Si la valeur est en dehors de l'intervalle alors il y a un biais de brin, un des deux brins est plus représenté que l'autre, on ne prend donc pas en compte la position. De même si une mutation est observée majoritairement sur un brin, la position est supprimée.

La formule utilisée pour évaluer le biais de brin est celle utilisée par le logiciel GATK (« strand bias estimated by the symmetric odds ratio test » www.software.broadinstitute.org/gatk/).

1-5 - Détection d'une mutation

Pour déterminer s'il y a mutation, il faut calculer une p-valeur à chaque position de base. C'est l'écart entre le bruit de fond du groupe contrôle et la valeur de l'allèle mineur pour une position du panel.

Après le calcul de ces p-valeurs, nous appliquons une méthode de sélection des « outliers » ou valeur aberrantes, que l'on considère comme des mutations. L'objectif étant d'obtenir deux populations bien définies, une population regroupant les positions non mutées et une population regroupant les positions mutées (illustration Figure 23).

Une position de base est considérée comme mutée si sa p-valeur est un « outlier ».

Quarante six positions génomiques du panel sont considérées comme des hotspots de mutations. L'interprétation de leur p-valeur est un peu moins stricte, afin de ne pas passer à côté d'un variant biologiquement relevant.

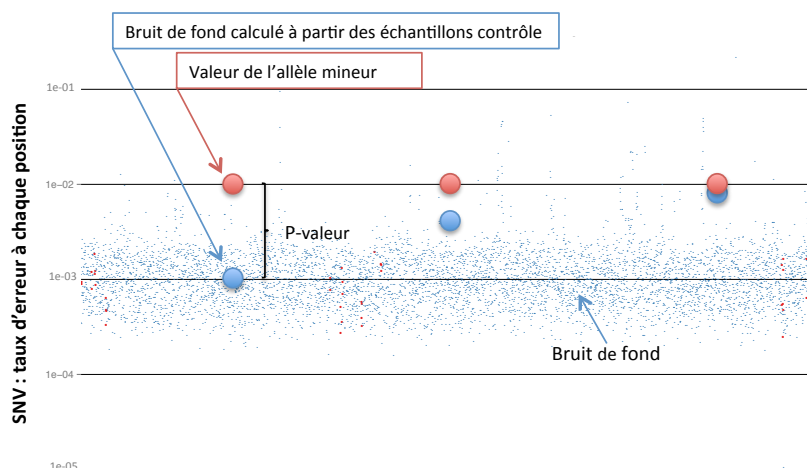


Figure 23 : Détection d'une mutation - représentation graphique des p-valeurs.

Comparaison de la fréquence de l'allèle mineur d'un échantillon avec le bruit de fond des contrôles. La distance (p-valeur) au bruit de fond permet de détecter spécifiquement la présence d'un variant. Plus la p-valeur est petite (ou la distance élevée) plus la mutation a de probabilité d'exister.

2 / Mise en place de la méthode sur des échantillons contrôles

L'estimation du taux d'erreur du NGS à chaque position (BPER) est réalisée sur de l'ADN de buffy coat de 29 échantillons contrôles.

Le panel commercial comporte 92 amplicons couvrant 22 gènes, plus particulièrement des régions hotspot de mutations. Le BPER a été mesuré sur les 8741 positions génomiques restantes après retrait des 8 bases en 3' et 5' et des positions polymorphiques. La moyenne de profondeur de lecture par amplicon est de 7115 ± 2596 lectures (illustration Figure 24).

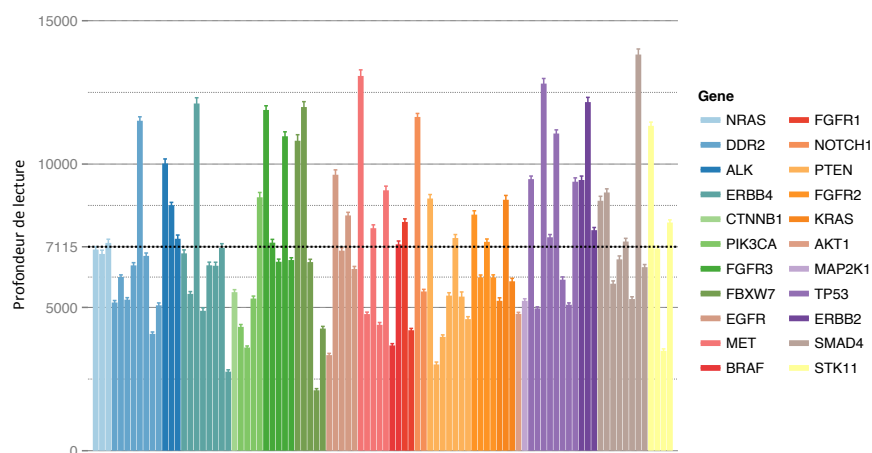


Figure 24 : Profondeur de lecture des 92 amplicons du panel Colon Lung pour les 29 échantillons contrôles.

Le graphique représente la profondeur de lecture des 92 amplicons des 22 gènes séquencés, pour les 29 échantillons contrôles. Chaque couleur correspond à un gène. La moyenne de profondeur est de 7115 lectures.

Lors de l'analyse, nous avons remarqué un taux très élevé d'erreur pour les INDEL de 1 ou 2 paires de bases (pb). Il est connu que la technologie de séquençage Ion Torrent™ génère fréquemment des erreurs de type INDEL associée aux homopolymères (l'enchaînement de plusieurs bases identiques dans une séquence provoque des erreurs d'interprétation). En effet, le signal de séquençage est une mesure de différence de pH suite à l'intégration d'un ou plusieurs nucléotides, le système fait bien la différence entre un différentiel de 1 unité et 0 mais moins bien entre 3 et 4 et encore moins bien entre 4 et 5 et ainsi de suite. De ce fait une succession de 4 « T » (4 unités) pourra apparaître sur certaines séquence en triplet (3 unités) ou quintuplé (5 unités) et générer du bruit de fond d'insertion-délétion de 1 nucléotide. Par conséquent nous avons retiré de l'analyse les INDEL inférieurs à 3pb car impossible à distinguer du bruit de fond (illustration du taux d'erreur des INDEL Figure 25).

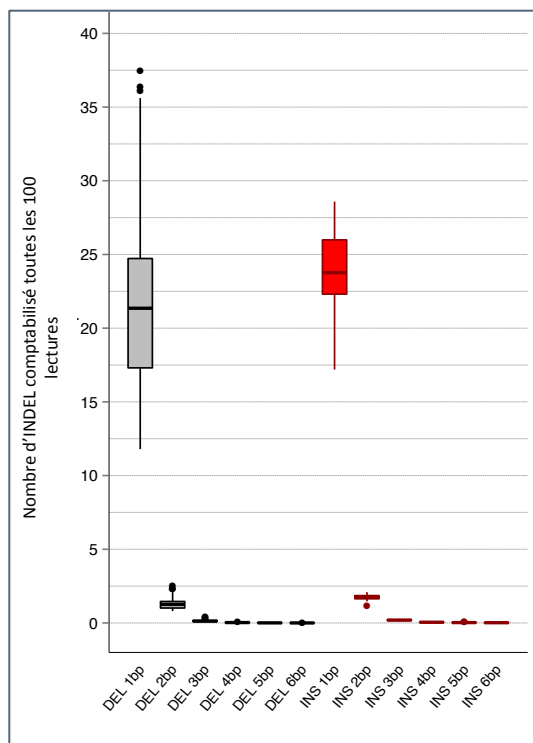
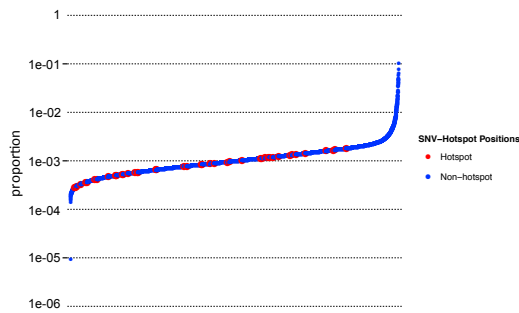


Figure 25 : Taux d'erreur des insertions et des délétions en fonction de leur nombre de paire de bases.

Nombre d'INDEL comptabilisé toutes les 100 lectures classé en fonction du nombre de paire de bases insérée ou délétée dans la série de 29 échantillons contrôle. En gris les délétions, en rouge les insertions. Le taux d'erreur des INDEL de 1 et 2 pb est trop important pour les distinguer du bruit de fond.

Nous avons ensuite calculé le taux d'erreur à chaque position pour les SNV et les INDEL. Leur BPER a été calculé séparément. Le BPER des SNV est compris entre 9.7×10^{-6} et 0.115 (avec une médiane à 9.85×10^{-4}) et le BPER des INDEL>2bp est compris entre 0 et 0.132 (avec une médiane à 2.07×10^{-5}) (Figure 26).

Calcul du bruit de fond base par base pour les SNV



Calcul du bruit de fond base par base pour les Insertion / Délétion

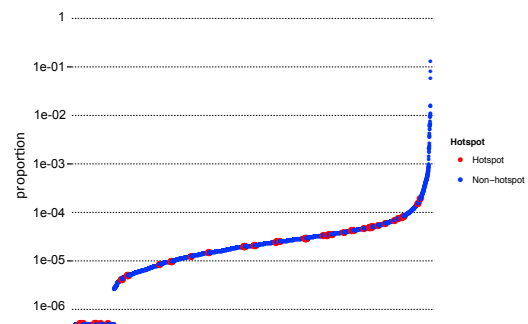


Figure 26 : Bruit de fond base par base des SNV et des INDEL.

Représentation du taux d'erreur à chaque position retrouvé sur les 8741 positions séquencées. En Rouge les positions hotspot de mutation, en bleu les positions non hotspot de mutation.

Les distributions des valeurs de BPER des échantillons contrôles suivent une courbe gaussienne. Nous avons exclus les positions de base trop bruitées qui se situaient en dehors de la courbe. Soit les positions supérieur à $K = 6.30 \times 10^{-3}$ pour les SNV et supérieur à $K' = 1.85 \times 10^{-3}$ pour les INDEL>2pb. Conservant ainsi 8304 positions interprétable pour les SNV et 8653 position pour les INDEL>2pb (Figure 27).

En effet il est inutile de chercher une sensibilité maximum sur une position du panel pour laquelle le bruit de fond est déjà supérieur à la sensibilité recherchée. Dans ce cas l'algorithme n'apporte rien par rapport au typage classique pour lequel l'identification des variants est « fixé » à 2%.

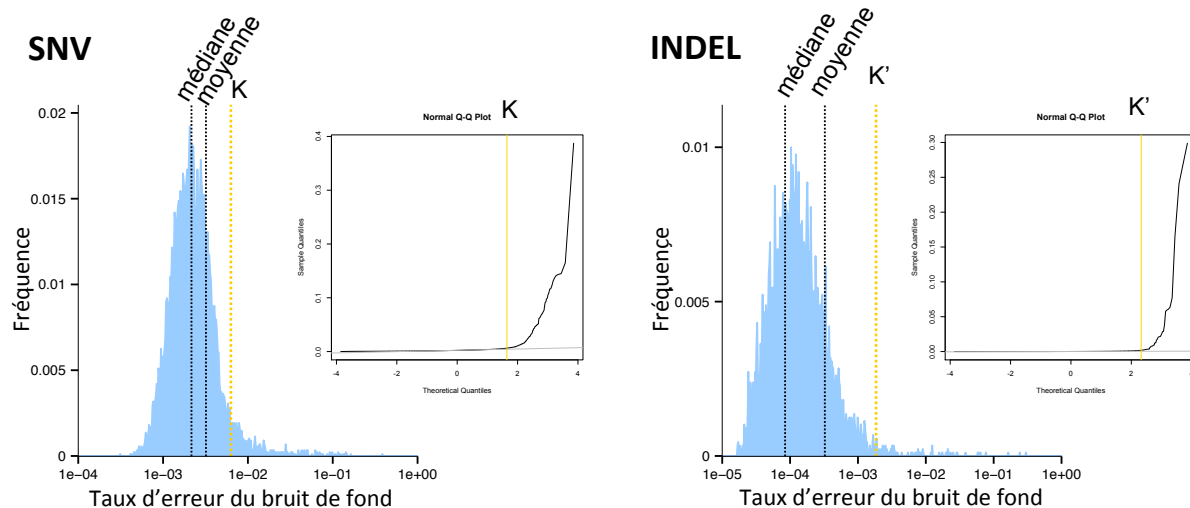


Figure 27 : Elimination des positions bruitées par l'étude de la distribution du bruit de fond à chaque position.

Les graphiques représentent la fréquence d'apparition des erreurs en fonction du taux d'erreur du bruit de fond des échantillons contrôles. Certaines positions trop bruitées ont été exclues de l'analyse, car se situant en dehors de la courbe gaussienne de distribution : décrochage de la loi Normale à partir de la position K et K', le taux d'erreur est trop important. Représentation Q-Q Plot de K et K' : quantile observé en fonction du quantile théorique. A partir de la valeur K et K', il n'y a plus de corrélation.

Pour pouvoir utiliser notre technique d'analyse, nous avons également validé que les 46 régions hotspot n'étaient pas bruitées et bien interprétables (Figure28). Toutes les régions sont en dessous des seuils définis plus tôt, K et K'. Aucune position hotspot n'est exclue de l'analyse.

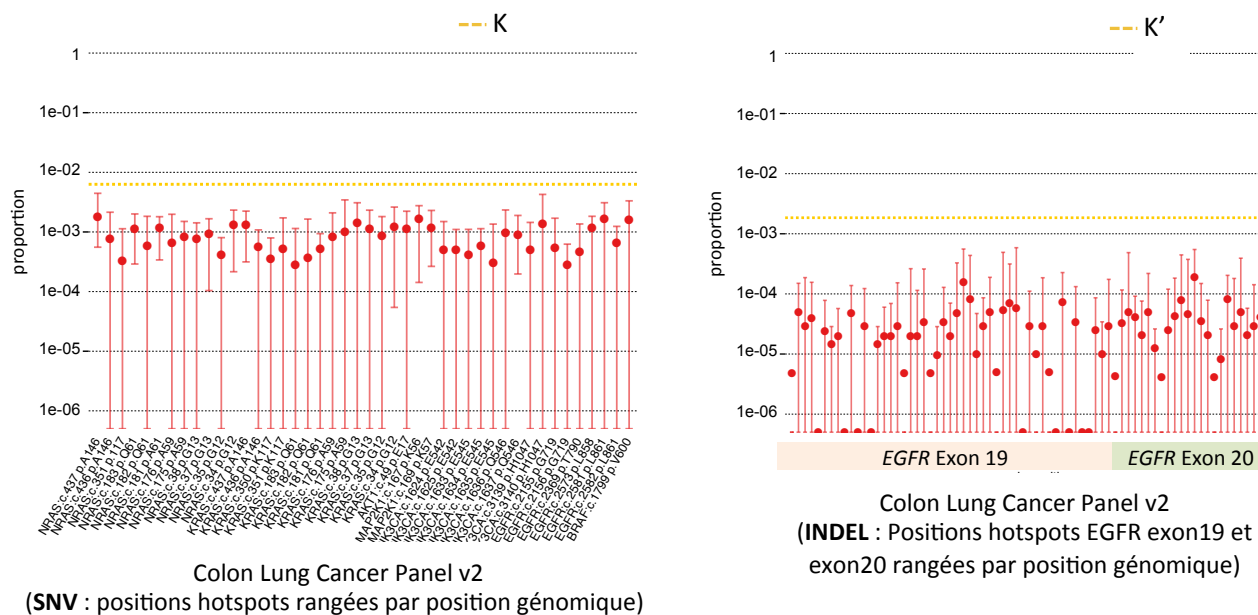


Figure 28 : Taux d'erreur du bruit de fond pour les 46 positions hotspots SNV et INDEL.

Toutes les mutations hotspots sont situées en dessous des seuils d'interprétation K et K'. Elles sont toutes interprétables.

3 / Validation de la technique

Afin de valider notre approche, nous avons testé notre méthode d'analyse sur deux autres séries d'échantillons, une série de 15 échantillons de plasma provenant de donneurs non atteints d'une affection cancéreuse et des échantillons commerciaux HD200, HD728 et HD780 pour lesquelles les fréquences alléliques et les mutations sont connues.

3-1 - Validation avec l'échantillon HD200 et une série de plasma

Nous avons eu 100% de détection dans les trois réplicats de l'échantillon commercial HD200 que nous avons séquencé, avec une fréquence allélique corrélée aux données du fournisseur avec un R^2 de 0,96 (Figure 29).

Par contre, deux mutations faussement positives ont été trouvée chez les donneurs sains : une mutation *TP53* p.M160V avec une fréquence allélique de 0,009 et une mutation *EGFR* p.G719S avec une fréquence allélique de 0,0016.

Les premières étapes de l'amplification par PCR utilisées par les technologies AmpliSeq™ peuvent produire des erreurs stochastiques, ce qui peut expliquer les rares cas de faux positifs. Néanmoins, le taux de faux positifs par million de base (Mb) par la méthode BPER est de $5,25 \times 10^{-6}$ / Mb, ce qui est inférieur à celui de l'analyse par amplicon proposé par Life technologies où il est de 3 / Mb.

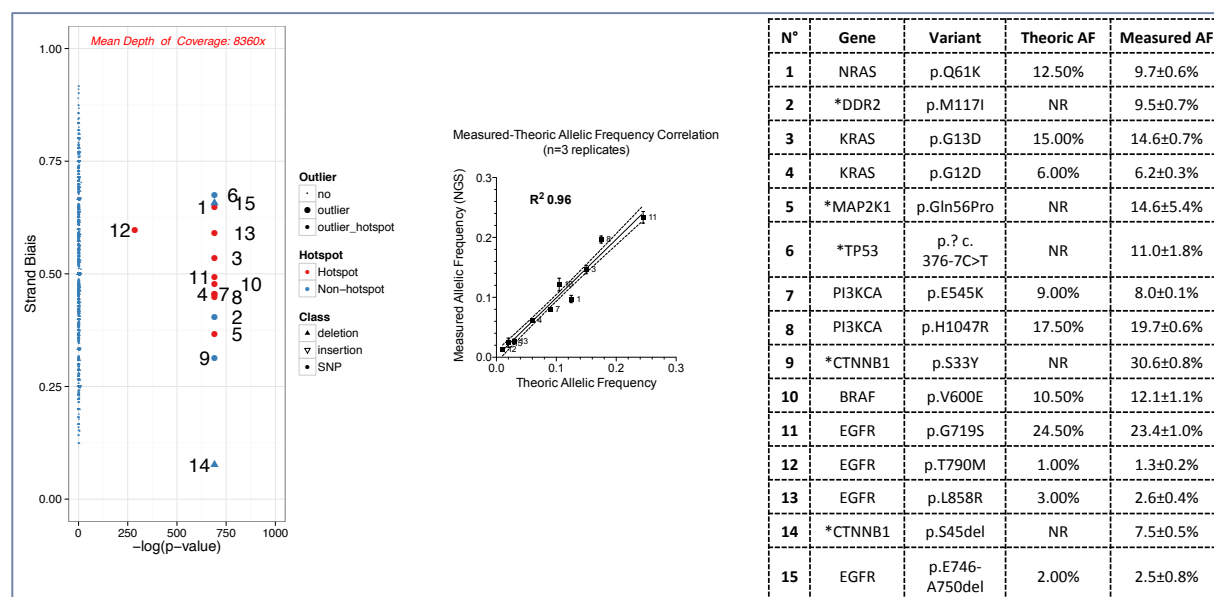


Figure 29 : Analyse en NGS du standard HD200.

Les points bleus et rouges représentent les différentes mutations référencées dans le tableau. Les points rouges correspondent aux hotspots de mutation, les bleus les non hotspots de mutation. Le triangle indique une délétion. Le tableau donné par le fournisseur liste les mutations et les fréquences alléliques correspondantes. L'* indique une mutation cherchée par le fournisseur mais sans donnée de fréquence allélique. La colonne « Theoric AF » correspond aux valeurs de fréquence allélique données par le fournisseur, la colonne « Measured AF » correspond aux valeurs de fréquence allélique retrouvée en NGS. Le graphique au centre représente la corrélation entre les fréquences alléliques théorique et les fréquences alléliques mesurées pour les 3 réplicas.

3-2 - Estimation de la limite de détection des hotspots

Afin d'estimer la limite de détection sur les hotspots des gènes *KRAS* et *EGFR*, nous avons fait la moyenne à chaque position de la profondeur (N0) des 15 donneurs sains et la moyenne BPER à chaque position de ces mêmes donneurs. Nous avons ainsi obtenu un échantillon synthétique.

A partir de cet échantillon synthétique, nous avons calculé informatiquement la limite de détection pour chaque hotspot. Cela a abouti à une limite de détection comprise entre 0,002 et 0,007 (0,002 : 2 allèles mineurs détectées sur 1000 allèles analysées soit une sensibilité de détection de la mutation à 0,2%) pour les hotspot SNV et entre 0,00001 et 0,0007 pour les hotspot INDEL>2pb.

Pour confirmer ces limites estimées de détection nous avons utilisé deux étalons de référence HD728 et HD780 que nous avons dilué (Résultats en Annexe 8 et 9).

La sensibilité de détection des SNV et des INDEL à une fréquence allélique de 0,01 est de 100% chez ces deux échantillons. Toutes les mutations attendues ont été détectées.

Pour les SNV, la sensibilité de détection pour une fréquence allélique de 0,005 est de 83% (5/6 mutations détectées) et de 0% (0/12 mutations détectées) pour une fréquence allélique de 0,001.

Pour les INDEL, la sensibilité analytique est de 100% (2/2 mutations détectées) et de 50% (2/4 mutations détectées) à une fréquence allélique de 0,005 et 0,001 respectivement.

La sensibilité analytique des INDEL à la fréquence allélique de 0,1% est limitée par la quantité d'ADN utilisé pour le séquençage. L'entrée d'ADN minimal pour atteindre 0,1% doit être supérieure à 10.000 allèles, correspondant à 33ng d'ADN avec une PCR efficace à 100%. Cependant, notre expérience clinique des échantillons d'ADNlc provenant de cancer pulmonaire ou colorectal, ainsi que les données de la littérature montrent que la concentration moyenne de l'ADNlc est de 30 ng/mL, avec près de 50% des échantillons à moins de 10 ng/mL. La limite de détection, est donc indissociable de la quantité d'ADN disponible au départ et du volume maximum possible d'ADN qui peut être analysé par amplification. Il faut bien différencier la sensibilité théorique de la méthode et la sensibilité individuelle atteignable liée à l'échantillon.

4 / Application sur une série d'échantillon

Nous avons mise en application notre méthode d'analyse sur une série d'ADNlc provenant d'une cohorte de plasma de patients avec un CBNPC, à l'initiation du traitement et pendant le suivi (273 échantillons de plasma).

Parmi les 273 échantillons analysés, 152 mutations ont été détectés avec une fréquence allélique minimale de 0,001 pour les INDEL>2pb et de 0,003 pour les SNV.

Parmi les échantillons positifs, 45% des mutations détectées ont une fréquence allélique inférieure à 0,02 (Figure 30). Pour rappel, l'algorithme d'analyse « classique » permet une identification des variants dont la fréquence allélique est supérieure à 2%. La méthode BPER a permis d'analyser quasi deux fois plus de patients.

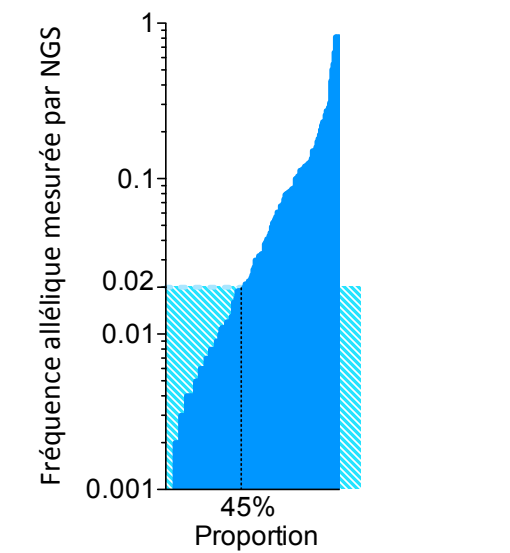


Figure 30 : Fréquences alléliques des 152 mutations retrouvées chez les 273 ADNlc analysés par la méthode BPER.

Validation de la méthode sur 273 plasmas de patients atteints d'un CBNPC, 45 % des échantillons testés ont une mutation avec une fréquence allélique inférieure à 2%.

5 / Comparaison NGS - dPCR sur une série d'échantillon plasmatique

Afin de valider notre méthode d'analyse nous avons comparé les résultats obtenus en NGS pour les mutations *KRAS* et *EGFR* avec ceux de la dPCR dans notre série de patients atteints d'un cancer du poumon. Les statuts mutationnels sont concordants chez 94,2% des patients (Tableau 9). Il y a 9 discordances : 9 mutations retrouvées seulement en NGS. Ces mutations ont été retrouvées dans les biopsies de tumeur, nous avons donc exclu le fait que ces mutations soient des faux-positifs.

La méthode BPER est analytiquement plus sensible que la dPCR concernant la détection des délétions sur l'exon-19 d'*EGFR* (BPER <0,001). L'analyse des échantillons en dPCR se fait avec une sonde multiplex contenant 19 sondes différentes. Les interactions entre ces sondes peuvent diminuer la sensibilité de l'analyse par rapport à d'autres sondes utilisées en dPCR. Ce qui expliquerait que nous ne retrouvions pas les 9 mutations détectées en NGS. Il est à noter que les délétions identifiées par NGS correspondaient à des sondes présentes dans le mélange réactionnel utilisé en dPCR.

La corrélation des résultats entre le NGS-BPER et la dPCR de la fréquence allélique des mutants est très bonne avec un R^2 de 0,85 (Figure 31).

Il existe une excellente corrélation à la fois sur le plan qualitatif et sur le plan quantitatif.

		dPCR	
		-	+
NGS – BPER	Résultats	-	+
	-	99	0
	+	9	46

Tableau 10 : Tableau de concordance des mutations entre l'analyse en NGS et l'analyse en dPCR.

Le tableau représente le nombre de mutations retrouvées lors de l'analyse en NGS-BPER et en dPCR, il y a 94,2% de concordance entre les deux méthodes. Neuf échantillons discordants, retrouvés mutés en NGS et pas en dPCR.

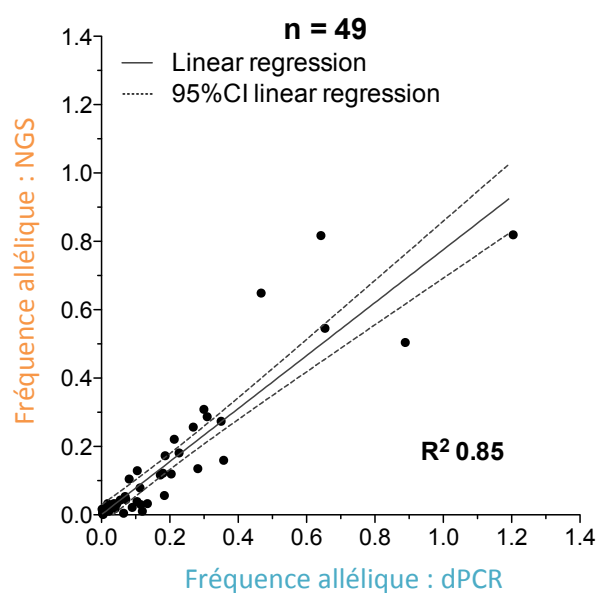


Figure 31 : Corrélation des résultats de fréquence allélique entre le NGS-BPER et la dPCR.

Le graphique représente la corrélation entre la fréquence allélique du NGS et la fréquence allélique en dPCR sur 49 mutations (46 échantillons dont 3 avec une mutation T790M en plus de la mutation initiale). La corrélation à un R^2 de 0,85.

6 / Exemple de suivi d'un patient sous traitement

L'analyse moléculaire de la tumeur d'un patient avec un cancer du poumon de stade IV a été menée dans le cadre du soin et montre une délétion sur l'exon 19 du gène *EGFR* et une mutation de *TP53*.

Ces deux mutations ont été trouvées dans le plasma de prétraitement (T0). Sous traitement, parallèlement à la réponse tumorale radiologique, nous avons vu la fréquence de ces mutations tumorales dans le plasma diminuer au 1^{er} et au 6^{ème} mois par rapport à T0 et une ré-ascension au 11^{ème} mois.

Comme illustré Figure 32 graphique E-F-G-H, à T0 en NGS, la fréquence allélique de la mutation *EGFR* est de 0,823 mais diminue jusqu'à pratiquement disparaître au 6^{ème} mois (0,0038) pour ré-augmenter au 11^{ème} mois avec une fréquence allélique de 0,0548.

La mutation *TP53* suit la même tendance, sa fréquence allélique à T0 est de 0,0831, elle va même disparaître complètement au 6^{ème} mois de traitement pour réapparaître au 11^{ème} mois avec une fréquence allélique de 0,0049.

Les résultats obtenus en NGS concernant la mutation *EGFR* sont validés en dPCR (graphique I-J-K-L). La mutation du gène *TP53* n'a pas été recherchée en dPCR.

Il est intéressant, à la rechute, d'observer que le rapport entre les mutations *TP53* et *EGFR* est resté le même qu'au début du traitement.

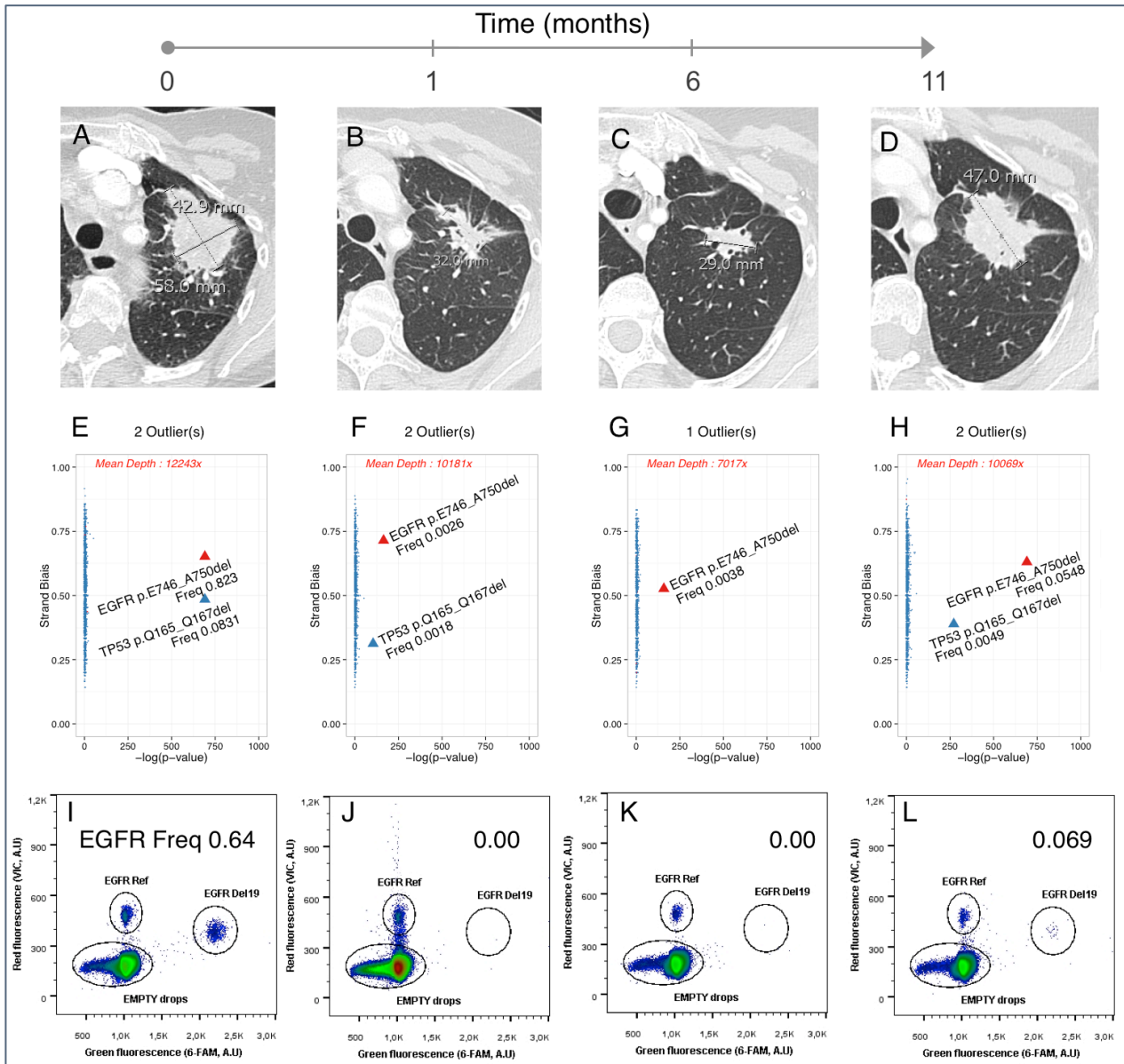


Figure 32 : Suivi de l'évolution de la tumeur chez un patient avec un CBNPC : radiologie, NGS et dPCR.

ABCD : Le suivi radiologique permet d'observer l'évolution de la masse tumorale au cours du temps. Après une diminution du volume tumoral, une nette augmentation est observée au 11^{ème} mois.

EFGH : Le séquençage suit les mutations retrouvées dans la tumeur dans le plasma : délétions EGFR et TP53. La fréquence allélique de la mutation diminue jusqu'au 6^{ème} mois de traitement et remonte à la progression.

IJKL : La dPCR suit la délétion exon 19 d'EGFR au cours du temps. Même interprétation que pour les figures EFGH.

7 / Conclusion

Nous avons mis au point une méthodologie d'analyse des données de séquençage NGS pour les ADN tumoraux circulant. Cette méthode devrait pouvoir être facilement appliquée à tous les panels à façon ou commerciaux Ion Panel AmpliSeq™. Elle nécessite d'être adaptée au cas par cas en analysant un ensemble d'échantillons contrôles afin de déterminer le bruit de fond par position pour chaque panel.

Elle permet une réduction des erreurs d'interprétation, notamment parce qu'elle ne prend pas en compte les INDEL < 2pb, et qu'elle analyse les données base par base et non pas par amplicons.

Cette méthode offre une sensibilité et une spécificité similaires à la dPCR sur les échantillons cliniques d'ADNtc (variations de nucléotides simples à 0,3% et insertion/délétion à 0,1%), mais elle a l'avantage d'être plus efficace car elle fournit des données sur une large gamme de mutations dans une seule expérience et avec un coût moindre.

Les positions non traitées par l'algorithme (exclues car très bruitées et les INDEL < 3pb) sont interprétées par un typage standard avec une sensibilité de détection fixée à 2%. L'analyse complète dans le cadre du soin d'un ADNtc comprend donc les deux étapes, afin de minimiser le risque de faux négatif : une interprétation des positions exclues qui seraient présente à plus de 2% dans le plasma et une interprétation des positions incluses dans l'algorithme pour toutes variations inférieur à 2%.

III / Analyse de l'ADNtc dans une cohorte de patient avec un CBNPC

Nous avons mené une étude prospective observationnelle chez des patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules au stade métastatique nouvellement diagnostiqué et recevant leur première ligne de traitement. Contrairement à d'autres types de cancer, la valeur pronostique de l'ADNtc est peu étudiée, c'est notamment dû à la faible quantité d'ADNtc disponible. En effet, dans le cancer du poumon EGFR muté, l'ADNtc n'est détecté que dans 62% des cas contrairement aux échantillons de patients avec un cancer colorectal *KRAS* muté (92%). D'où l'intérêt d'optimiser l'extraction de l'ADNtc et l'analyse des données.

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer la valeur pronostique de la détection d'ADNtc avant le début du traitement sur la survie globale du patient. Les objectifs secondaires sont d'évaluer l'impact de la quantité d'ADNtc détectée chez le patient sur le pronostic, au début et au cours du traitement. Et enfin de rechercher des mutations secondaires survenues au cours du traitement liées à la résistance au médicament.

Les patients n'étant pas sélectionnés en fonction de l'existence d'une mutation tumorale *EGFR* ou *KRAS*, nous avons donc décidé de traiter les échantillons en NGS et d'appliquer notre technique d'analyse statistique BPER. Avec cet outil, nous avons analysé le tissu tumoral des patients ainsi que leurs ADN circulant. Des échantillons de sang ont été prélevés au début du traitement, au cours du suivi puis à la progression radiologique. En parallèle de cette approche, nous avons validé la présence des mutations et quantifié l'ADN tumoral circulant avec une technique de dPCR.

1 / Sélection des échantillons et comparaison de méthode d'analyse

1-1 - Sélection des échantillons

La Figure 33 décrit la cohorte analysée dans cette étude. La population totale comprend 124 individus mais seulement 109 patients répondent à tous les critères d'inclusion : un CBNPC de stade IV, une mutation retrouvée dans le tissu tumoral (n=104), ou dans le cas où le tissu n'est pas disponible ou que le tissu est non muté, une mutation retrouvée dans le plasma à l'initiation du traitement (n=5). Trois patients ont été exclus car le stade de leur cancer ne rentre pas dans le cadre de l'étude, 12 autres patients sont exclus car leur plasma à T0 ou leur tissu n'est pas muté.

Les données des patients sont regroupées dans la Table 11.

Dans cette étude, les prélèvements de plasma ont été fait à l'initiation du traitement (T0), à la première évaluation E1 (6 semaines plus ou moins 2 semaines), et à la progression radiologique selon les critères RECIST (ToP) (Figure 34).

Cent cinq plasmas sont disponibles à T0, 85 à la première évaluation et 66 à la progression tumorale. Une mutation spécifique de la tumeur a pu être suivie chez 89% des patients.

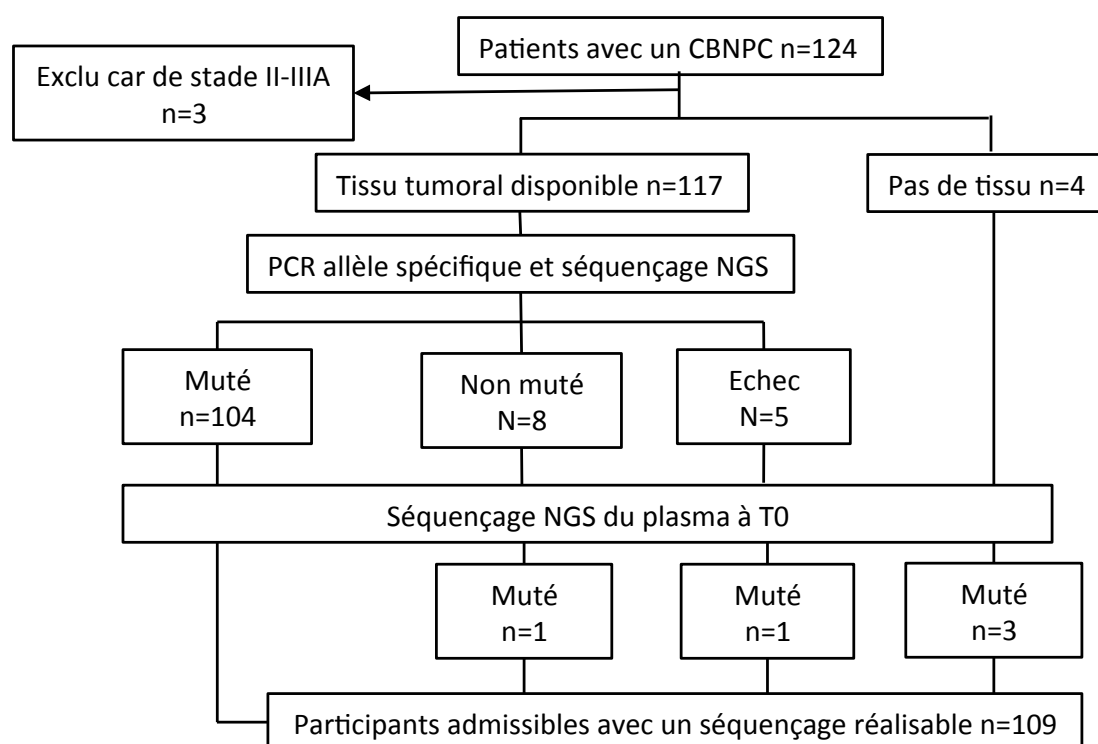


Figure 33 : Description de l'étude.

Sélection des patients en fonction de la disponibilité du tissu tumoral avec une mutation ou la présence d'une mutation dans le plasma à T0. Les mutations sont détectées avec une technique de PCR allèle spécifique et validée avec un séquençage en NGS. Sur les 124 patients inclus dans l'étude, 109 sont analysables.

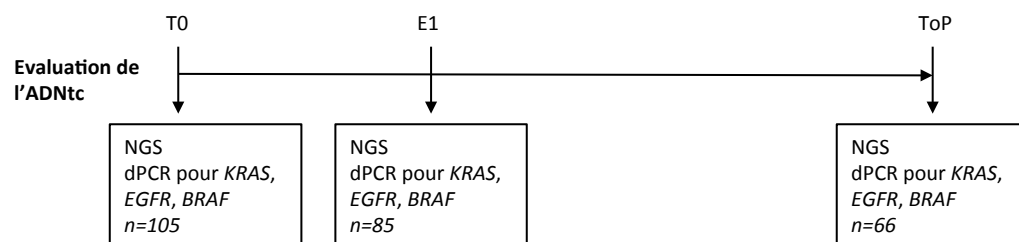


Figure 34 : Evaluation de l'ADNtc chez les patients à l'initiation du traitement, à la première évaluation et à la progression.

La mutation détectée dans la tumeur est cherchée dans les plasmas à T0, E1 et ToP en NGS (22 gènes) et en dPCR (gènes EGFR, KRAS et BRAF).

Caractéristiques	N /109	%
Genre		
Homme	49	45
Femme	60	55
Age		
< 70 ans	67	61
≥ 70 ans	42	39
Antécédents de tabagisme		
Présent ou ancien	73	67
Jamais	36	33
Indice de performance (OMS)		
0-1	71	65
2-3	38	35
Type histologique		
Non épidermoïde CBNPC	98	90
Epidermoïde CBNPC	11	10
Stade de la tumeur (UICC 7th)		
IIIB	12	11
IV	97	89
Somme des diamètres des masses tumorales		
≤ 7.5cm	66	63
>7.5 cm	39	37
Site métastatique		
Osseux	52	48
Foie	9	8
Cerveau	22	20
Mutations		
TP53	65	60
EGFR	47	43
KRAS	29	27
Traitement		
Chimiothérapie	73	67
ITK EGFR	36	33

Tableau 11 : Caractéristiques des 109 patients à T0.

Les patients sont caractérisés en fonction du sexe, de l'âge, des antécédents de tabagisme, de l'indice de performance, du type histologique, de la somme des diamètres des masses tumorales, des sites métastatiques, des mutations de la tumeur ou du plasma à T0 et du traitement.

1-2 - Comparaison NGS - dPCR

Les 105 plasmas T0, les 85 plasmas E1 et les 66 ToP ont été analysés en dPCR et en NGS. Nous avons comparé les résultats de mutation et de fréquence allélique obtenus pour chacune des évaluations. Les résultats présentés sont ceux obtenus pour les plasmas à T0 (Figure 35), les mêmes résultats sont retrouvés à la première évaluation et à la progression.

Dans le cadre de l'analyse en dPCR, nous n'avons pris en compte que les patients avec une mutation sur les sites hotspots d' *EGFR*, *KRAS* et *BRAF* présente dans le tissu ou à T0 (si le tissu tumoral n'était pas disponible), soit 59 patients. Nous en avons comptabilisé 35 mutés sur 59 contre 41 patients mutés sur 59 en NGS. Dans cette série, seul un patient non muté en NGS l'était en dPCR.

Ces données montrent une corrélation élevée entre les deux techniques (Kappa 0.74, 95%CI 0.42-1.06, Figure 35). De même, la mesure des fréquences alléliques de 0,001 à 0,81 est très bien corrélée avec un R2 de 0,88 et un P<0,0001 (Figure 36).

Nous avons de nouveau noté une meilleure sensibilité de détection de la délétion del19 d'*EGFR* en NGS par comparaison à la dPCR (19 vs. 13 positif, 4 vs. 6 négatif et 0 vs. 4 non interprétable). C'est cette différence qui explique un bon degré d'accord de 0.74.

L'analyse par NGS permet le séquençage de 22 gènes. Il a permis de détecter de l'ADNtc à T0 chez 75 patients sur 105 mais ils ne sont plus que 41 sur 105 si le panel est restreint au gène *EGFR*, *KRAS* et *BRAF*. La différence est essentiellement due au séquençage de *TP53*, mutation largement retrouvée dans le cadre de notre analyse, présente dans le panel et non testée en dPCR (Figure 37).

En résumé, dans le cas où seuls les gènes *EGFR*, *KRAS* et *BRAF* sont analysés, les deux techniques peuvent être utilisées. La différence d'efficacité dans la détection de mutation n'étant pas significative. Par contre elle devient significative dès que l'analyse est faite sur les 22 gènes du panel. Le NGS est alors plus efficace que la dPCR, il permet d'augmenter le nombre de patient analysable de 59 à 105.

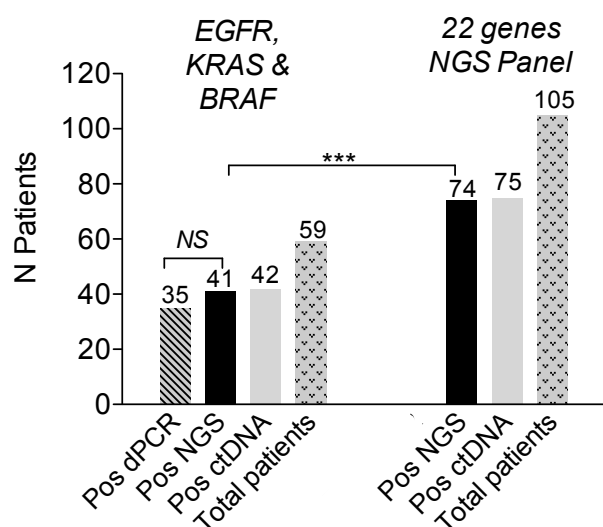


Figure 35 : Comparaison du NGS et la dPCR dans la détection de mutation dans le plasma à T0.

Diagramme représentant le nombre de patient avec une mutation en fonction de la méthode de détection et de la localisation (plasma ou tumeur).

Groupe EGFR, KRAS, BRAF : Pos dPCR : patient avec une mutation dans le plasma détectée en dPCR (n=35), Pos NGS : patient avec une mutation dans le plasma détectée en NGS (n=41), Pos ctDNA : nombre de patient total avec une mutation détectée dans le plasma (n=42, une mutation détectée en dPCR et non détectée en NGS), total patients : nombre de patient avec une mutation EGFR, KRAS ou BRAF dans la tumeur (n=59).

Groupe 22 gènes NGS Panel : Pos NGS : nombre de patients dont le plasma est positif en NGS (n=74), Pos ctDNA : nombre de plasma total positif (n=75, une mutation détectée en dPCR et non détectée en NGS), total patient : nombre de patient avec une tumeur mutée dont l'ADNtc à T0 est disponible (n=105).

La différence d'efficacité dans la détection de mutation est significative dès que l'analyse est faite sur les 22 gènes du panel.

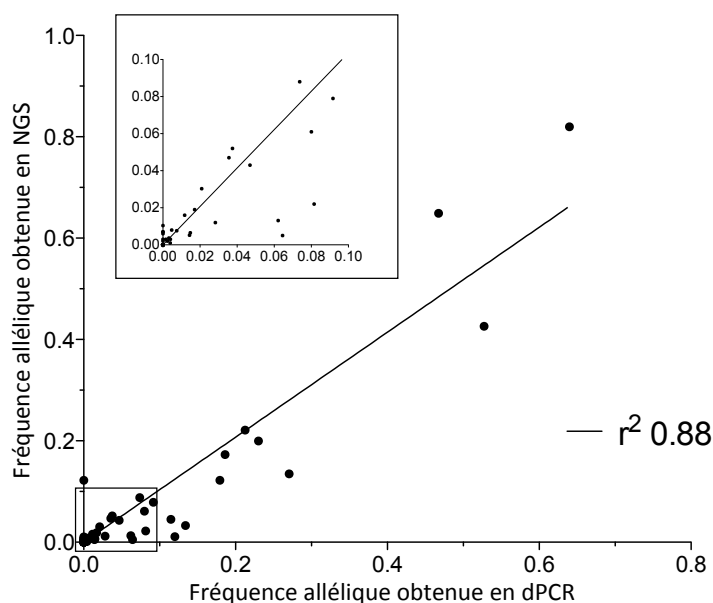


Figure 36 : Corrélation des fréquences alléliques entre le NGS et la dPCR.

Corrélation des fréquences alléliques des mutations retrouvées dans les plasmas à T0 entre la technique NGS et dPCR. La mesure des fréquences alléliques de 0,001 à 0,81 est très bien corrélée avec un R2 de 0,88 et un P<0,0001.

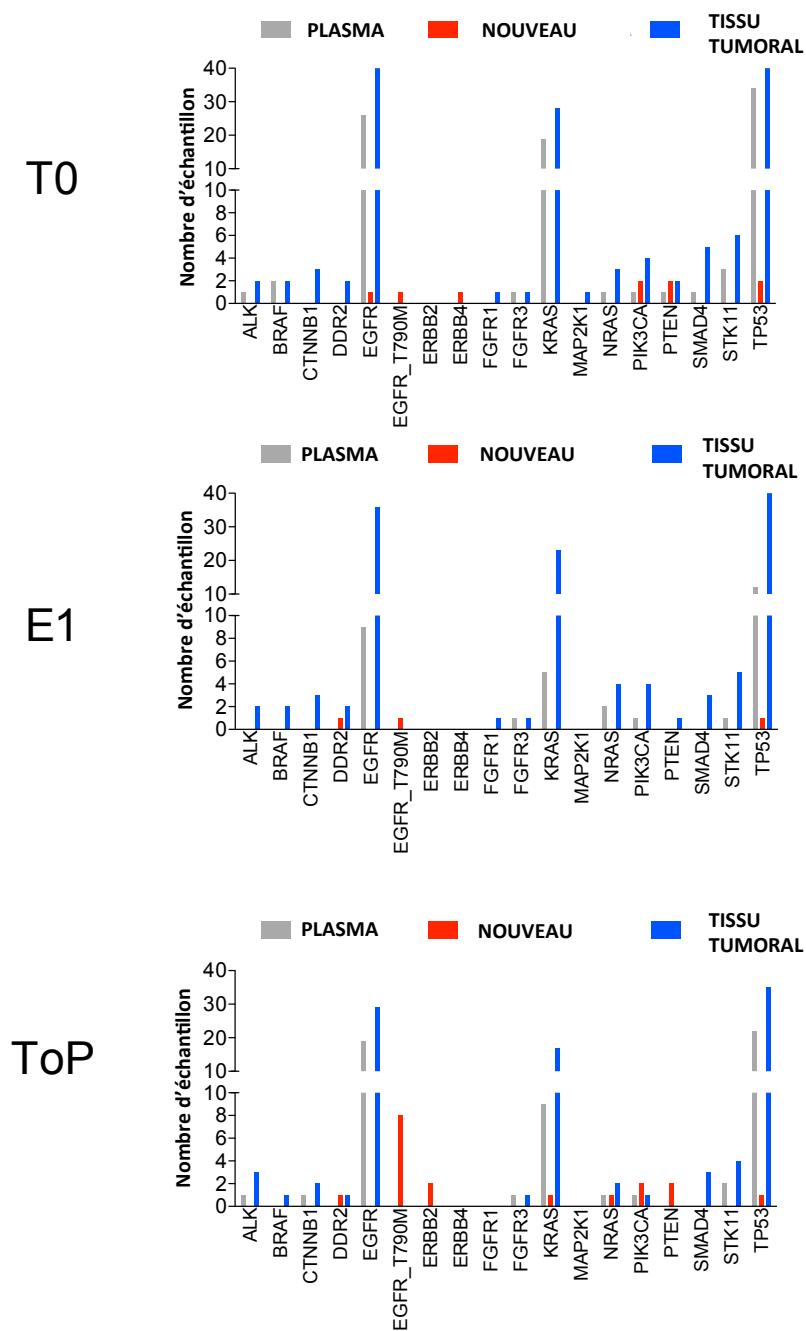


Figure 37 : Répartition des altérations moléculaires dans le plasma à T0, E1 et ToP.

Nombre d'échantillon muté pour chacun des gènes testés à T0, E1, ToP. En gris les altérations moléculaires présentent dans le plasma et détectées dans la tumeur, en rouge les altérations moléculaires présentent dans le plasma et non détectées dans la tumeur, en bleu les altérations moléculaires retrouvées dans le tissu tumoral. Les mutations les plus fréquentes sont celles de TP53, EGFR et KRAS et la mutation EGFR p.T790M à la progression.

2 / Lien entre la présence d'ADNtc à T0 et le pronostic de survie

2-1 - Présence d'ADNtc à T0

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer la présence ou non de mutation pour chacun des échantillons plasmatique disponible à T0, soit 105 patients. Cent neuf patients sont éligibles au séquençage, mais 4 patients n'ont pas de plasma évaluable à T0.

Sur les 105 patients, 75 ont de l'ADNtc détectable à T0 soit 71,4% des patients (95%CI, 60-82%, Tableau 11), incluant 42,9% de patients avec 1 mutation, 27,6% avec 2 mutations et 0,9% avec 3 mutations.

La quantité moyenne d'ADNtc est de 0,12 ng/mL de plasma extrait.

Temps du traitement	Initiation (T0)	
	N plasma /109	Médiane ou % [95%CI]
Caractéristiques		
Taux de positivité de l'ADNtc (%)	105	71.4% (n=75)
Quantité d'ADNtc (ng/mL plasma)	105	0.12 [0-0.79]

Tableau 12 : Nombre de plasma T0 avec de l'ADNtc.

Sur les 105 plasmas analysés en NGS, 75 plasmas ont de l'ADNtc, avec une quantité moyenne d'ADNtc de 0,12 ng/mL.

La Figure 38 illustre la répartition des mutations échantillon par échantillon. Chaque colonne représente un échantillon de plasma à T0 et chaque ligne un gène du panel Colon-Lung. Si la case est colorée et/ou encadrée alors l'échantillon présente la mutation. Les cases encadrées de rouge correspondent aux mutations trouvées dans le tissu tumoral et dans le plasma à T0, encadrée en bleue, aux mutations trouvées seulement dans le plasma à T0 et les cases non encadrées mais colorées, aux échantillons dont la mutation n'a pas été retrouvée dans le plasma à T0.

Les mutations faux sens sont colorées en vertes, les insertions et délétions (conservation du cadre de lecture) en grises, et les mutations tronquantes en noires.

Les mutations de *TP53* sont retrouvées dans 60% des plasmas, les mutations *EGFR* dans 43%, et les mutations *KRAS* dans 27% des cas. Il s'agit des 3 gènes les plus mutés.

Chez 8 patients avec de l'ADNtc, 9 mutations ont été retrouvées dans le plasma à T0 alors qu'elles n'étaient pas identifiées initialement dans la tumeur : 1 délétion sur l'exon 19 d'*EGFR*, 1 mutation p.T790M, 2 mutations *TP53*, 2 mutations *PTEN*, 1 mutation *ERBB4* et 2 mutations *PIK3CA*.

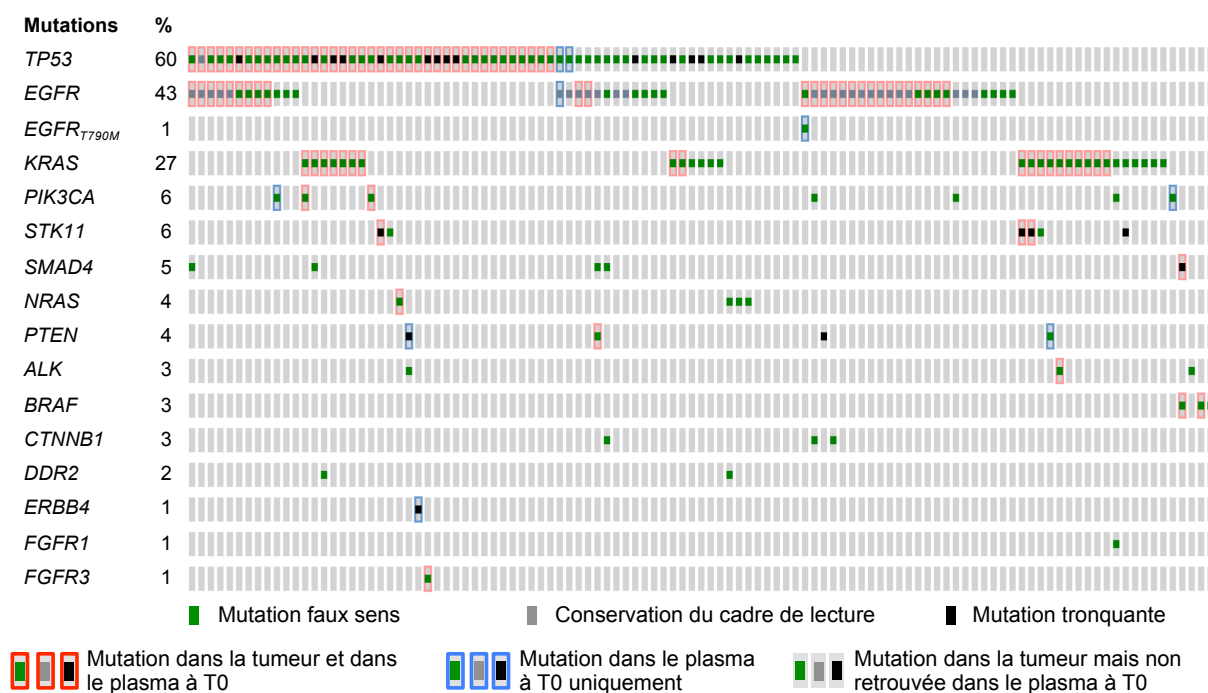


Figure 38 : Répartition des mutations chez les 105 patients évaluables à T0.

Chaque colonne correspond à un patient. Chaque ligne correspond à un gène pour lequel une mutation a été identifiée au moins une fois sur les 105 échantillons.

Carré vert : mutation faux sens, carré gris : décalage du cadre de lecture, carré noir : mutation tronquante. Carré coloré entouré de rouge : mutation retrouvée dans la tumeur et dans le plasma à T0. Carré coloré entouré de bleu : mutation retrouvée dans le plasma à T0. Carré coloré non entouré : mutation présente dans la tumeur non retrouvée dans le plasma à T0. 71,4% ont de l'ADNtc, 42,9% des patients ont une mutation, 27,6% ont deux mutations et 0,9% ont 3 mutations. Les mutations les plus fréquentes sont celles de TP53, EGFR et KRAS.

2-2 - Courbes de survies à T0

Dans un second temps, nous avons tracés et comparés les courbes de survie globale et de survie sans progression des patients dont le plasma est analysé, afin de déterminer si la présence d'ADNtc à T0 est associée à un moins bon pronostic.

Les patients ont été suivis en moyenne pendant 18,8 mois, 94 évènements ont été pris en compte pour l'analyse de survie sans progression (progression radiologique de la maladie ou décès) et 63 pour la survie globale (décès toutes causes confondues).

La présence d'ADNtc à T0 est associée à une médiane de survie globale de 13,6 mois contre 21,5 mois pour les patients sans ADNtc à T0 ($P = 0.03$) et une médiane de survie sans progression de 4,9 mois contre 10,4 mois ($P = 0.0003$) (Figure 39).

L'analyse multivariée confirme la première analyse, la présence d'ADNtc à T0 est associée à une survie globale inférieure (le rapport des risques est de 1,82 (IC à 95% 1,01 à 3,55, $P = 0,045$)) et de 2,14 (IC 95%, 1,30 à 3,67 $P = 0,002$) pour une survie sans progression.

La présence d'ADNtc à T0 est un marqueur indépendant et de mauvais pronostic.

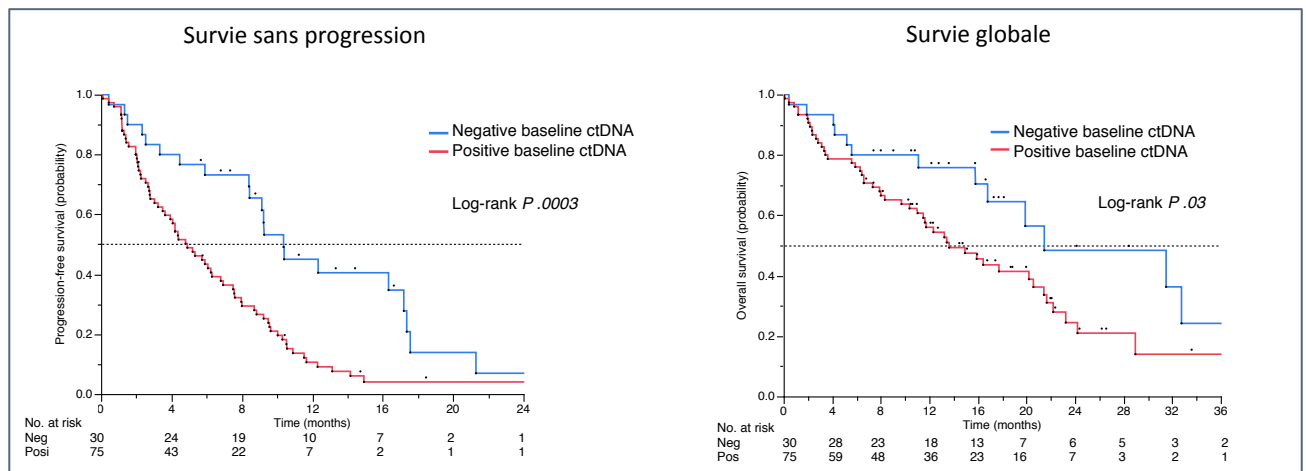


Figure 39 : Courbes de survie sans progression et de survie globale à T0.

En bleu : les patients sans ADNtc détectable à T0, en rouge : les patients avec de l'ADNtc détectable à T0. Analyse réalisée sur 105 patients. A chaque point noir sur les courbes correspond un évènement. Le tableau sous le graphique représente le nombre de patients avec ou sans mutation restant dans l'analyse après la prise en compte des évènements. Ces valeurs sont données tous les mois. La présence d'ADNtc à T0 est associée à une médiane de survie globale de 13,6 mois contre 21,5 mois pour les patients sans ADNtc à T0 ($P = 0.03$) et une médiane de survie sans progression de 4,9 mois contre 10,4 mois ($P = 0.0003$).

2-3 - Impact de la quantité d'ADNtc à T0 sur la survie

Nous savons que la présence d'ADNtc à T0 est un marqueur indépendant et de mauvais pronostic. Afin de déterminer si la quantité d'ADNtc a un impact sur la survie, nous avons classés les patients en tertiles ($n = 35$ patients par tertile), un premier groupe avec une quantité d'ADNtc faible ($<0,027$ ng/mL), un groupe intermédiaire ($0,027$ à $0,50$ ng/ml) et un groupe avec une quantité d'ADNtc élevée ($> 0,50$ ng/ml).

Le taux d'ADNtc est lié à la masse tumorale et à la présence de métastase hépatiques (Figure 40).

Une quantité d'ADNtc élevée est associée à une charge tumorale élevée évaluée selon les critères RECIST, et à la présence de métastases hépatiques. L'analyse multivariée montre que les métastases hépatiques sont indépendamment associées à la quantité d'ADNtc ($P < 0.008$).

En ce qui concerne le pronostic (illustration Figure 41), la médiane de survie globale est de 13.0, 13.4 et 21.5 mois ($P = 0.03$) et la médiane de survie sans progression de 4.1, 5.7 et 10.4 mois ($P < 0.0001$) pour les groupes avec un haut taux d'ADNtc, un taux moyen et un taux bas, respectivement. Plus la quantité d'ADNtc est élevée plus la médiane de survie est basse.

La quantité d'ADNtc est donc un marqueur de mauvais pronostic.

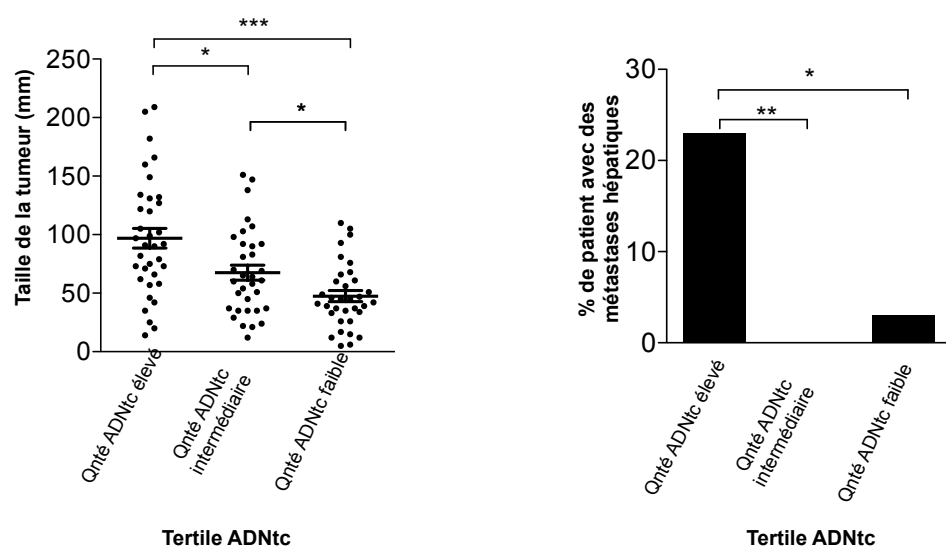


Figure 40 : Lien entre ADNtc, taille de la tumeur et présence de métastase hépatique.

A : taille en mm de la masse tumorale pour chacun des patients ayant de l'ADNtc, répartition en tertile. Tous les tertiles sont significativement différents les uns des autres. Plus particulièrement entre le groupe avec un taux d'ADNtc élevé et le groupe avec un taux d'ADNtc faible.

B : diagramme représentant le pourcentage de patient avec des métastases dans le foie en fonction des tertiles. Le tertile élevé est significativement différent du tertile intermédiaire et du tertile faible.

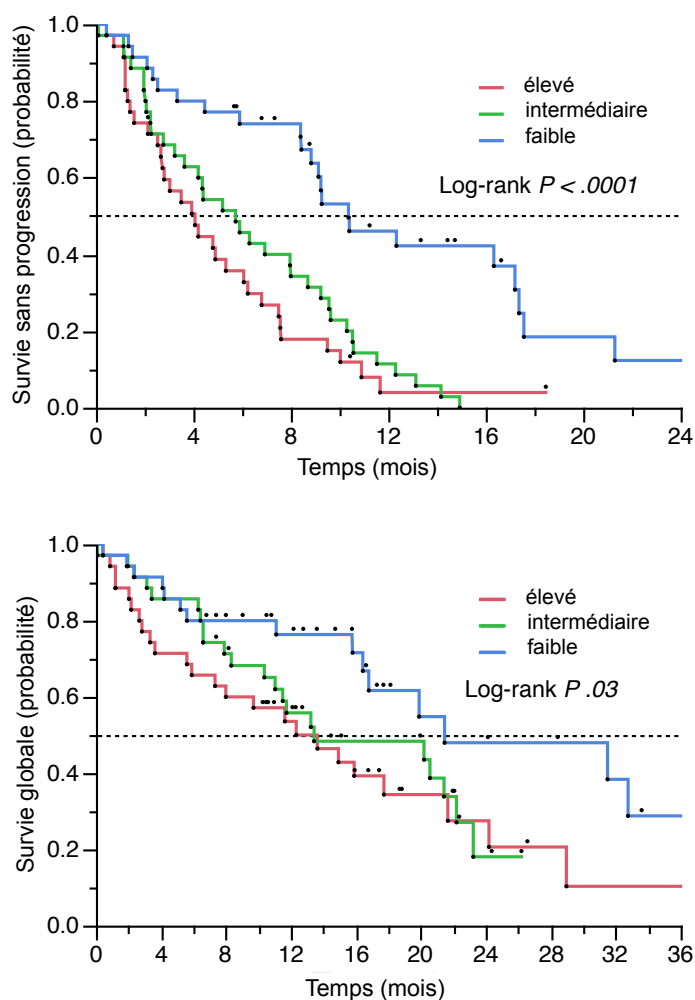


Figure 41 : Courbes de survie en fonction des tertiles à T0.

Représentation de la probabilité de survie sans progression ou de survie globale des patients en fonction du temps. En rouge le tertile avec une quantité d'ADNtc élevé, en vert une quantité d'ADNtc intermédiaire et en bleu une quantité d'ADNtc faible. A : survie sans progression, B : survie globale. Analyse réalisée sur 105 patients. A chaque point noir sur les courbes correspond un événement. La médiane de survie globale est de 13,0, 13,4 et 21,5 mois ($P = 0.03$) et la médiane de survie sans progression de 4,1, 5,7 et 10,4 mois ($P < 0,0001$) pour les groupes avec un haut taux d'ADNtc, un taux moyen et un taux bas, respectivement.

3 / Suivi précoce de la réponse tumorale via l'utilisation de l'ADNtc

Afin de déterminer si l'ADNtc peut être utilisé comme marqueur de suivi précoce de la réponse tumorale, les patients ont été prélevés lors de leur première évaluation, soit à environ 6 semaines de traitement.

Sur les 109 patients suivis, 85 ont un prélèvement plasmatique disponible à E1, dont 27 avec de l'ADNtc (32%) et 58 sans ADNtc (Tableau 13).

Temps du traitement	Initiation (T0)		Première évaluation (E1)		Progression (ToP)	
	N plasma /109	Médiane ou % [95%CI]	N plasma /109	Médiane ou % [95%CI]	N plasma /109	Médiane ou % [95%CI]
Caractéristiques						
Taux de positivité de l'ADNtc (%)	105	71.4% [60-82] (n=75)	85	32% [19-45] (n=27)	66	71.2% [57-83] (n=47)
Quantité d'ADNtc (ng/mL plasma)	105	0.12 [0-0.79]	85	0 [0-0.06]	46	0.09 [0.009-1.23]

Tableau 13 : Nombre de plasma avec de l'ADNtc à T0, E1 et à ToP.

Sur les 85 plasmas analysés en NGS, 27 plasmas ont de l'ADNtc, avec une quantité moyenne d'ADNtc variant entre 0 et 0,06 ng/mL de plasma extrait.

Le nombre de patients avec de l'ADNtc détectable diminue à la première évaluation par rapport à T0. Il passe de 71,4% à 32% mais ré-augmente à la progression (ToP) pour atteindre de nouveau la valeur de T0 avec 71,2% (Tableau 12, dernière colonne).

La Figure 42 illustre l'évolution de l'ADNtc entre T0 et E1. Treize des 85 patients voient leur ADNtc augmenté entre T0 et E1, 14 ont une quantité d'ADNtc qui diminue entre T0 et E1 et 32 normalise leur ADNtc entre T0 et E1. Vingt trois patients n'ont ni ADNtc à T0 ni à E1, tandis que 3 plasmas sont ininterprétables (figures A-B-C-D).

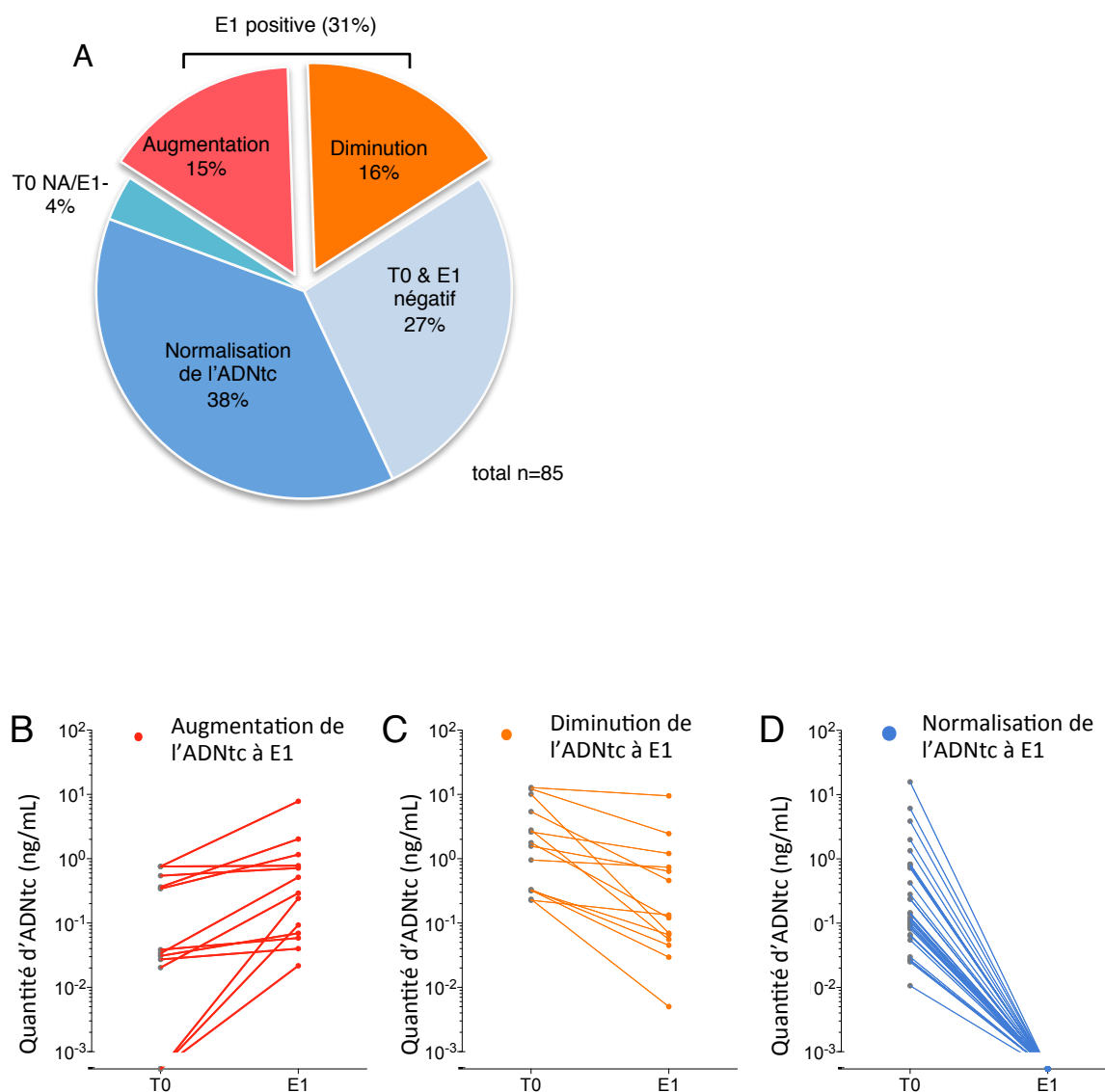
La figure E, courbe bleue foncée montre que la normalisation de l'ADNtc à E1, c'est à dire la disparition complète d'ADNtc lors de la première évaluation, est un meilleur marqueur pronostique de survie sans progression que la diminution de la quantité d'ADNtc entre T0 et E1. La diminution ou l'augmentation de la quantité d'ADNtc entre T0 et E1 correspond à un mauvais pronostique de survie sans progression. Tandis que l'absence ou la disparition de l'ADNtc est un bon marqueur de pronostique.

La positivité de l'ADNtc à E1 est associée à la progression de la tumeur selon les critères radiologiques RECIST (Figure F) et à une survie sans progression plus courte (médiane 2,8 vs. 9,6 mois, $p < 0,0001$, Figure G), ce qui traduit une survie globale également plus courte (médiane 8,0 vs. 23,2 mois, $p < 0,0001$; Figure H).

Après l'initiation du traitement, l'ADNtc résiduel à E1 est une évaluation précoce de mesure de l'efficacité du traitement lié à la réponse radiologique. La présence d'ADNtc à E1, suggère que le traitement n'est pas ou peu efficace.

L'absence d'ADNtc à la première évaluation E1 prédit la survie globale indépendamment de l'évaluation RECIST (maladie qui progresse par rapport à la maladie stable) ($P = 0,0007$).

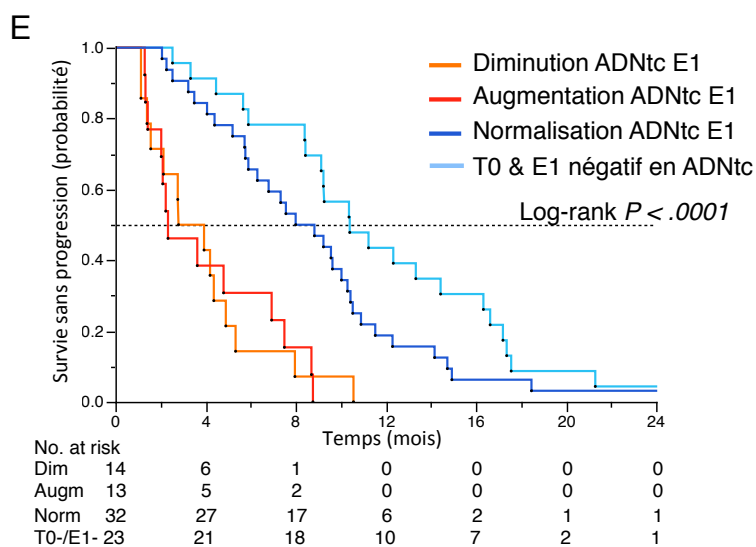
Figure 42 : Evolution des 85 échantillons ayant un prélèvement plasmatique disponible à E1.entre T0 et E1.



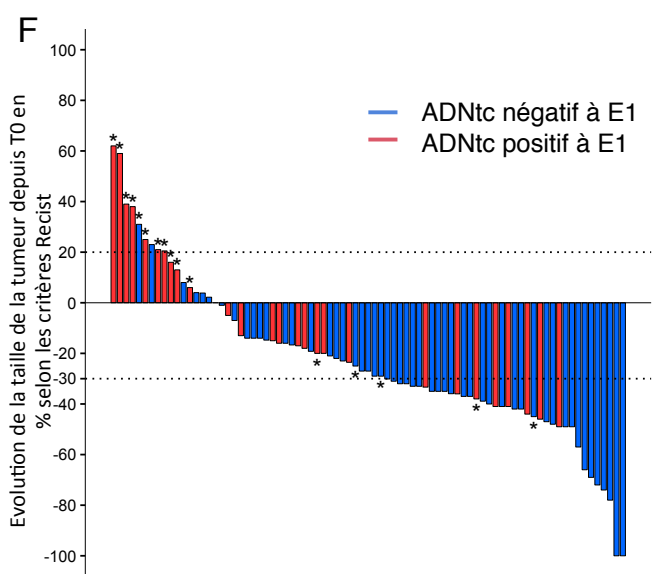
A B C D: Evolution de la quantité d'ADNtc (ng/mL) entre T0 et E1.

A : Le diagramme circulaire représente la répartition des 85 échantillons disponibles à E1 en fonction de l'évolution du taux d'ADNtc (ng/mL) entre T0 et E1. En rouge, les patients qui voient leur taux d'ADNtc augmenter entre T0 et E1. En orange, les patients qui voient leur taux d'ADNtc diminuer entre T0 et E1. En Bleu foncé, les patients qui normalise leur taux d'ADNtc. En bleu claire, les patients qui n'ont pas d'ADNtc à T0 et E1. En turquoise, 3 patients non interprétables.

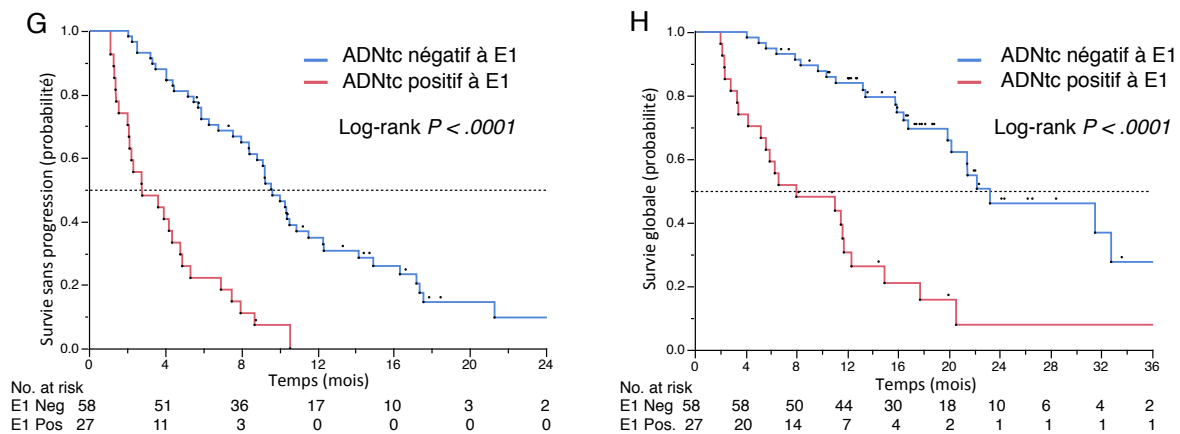
Les graphiques B, C et D illustrent le diagramme circulaire.



E : Courbe de survie sans progression, les patients sont répartis en fonction de l'évolution du taux de leur ADNtc entre T0 et E1. Courbe orange : diminution, courbe rouge : augmentation, courbe bleu foncée : normalisation et courbe bleu claire : T0 et E1 négatif en ADNtc.



F : Waterfall plot représentant l'évolution de la tumeur en pourcentage selon les critères RECIST, entre T0 et E1 (la valeur zéro correspondant au temps T0) et la présence ou non d'ADNtc à E1. La positivité de l'ADNtc à E1 est associée à la progression de la tumeur selon les critères radiologiques RECIST



G : Courbes de survie sans progression, ADNtc positif à E1 et ADNtc négatif à E1. H : courbes de survie globale, ADNtc positif à E1 et ADNtc négatif à E1. La positivité de l'ADNtc à E1 est associée à une survie sans progression plus courte (médiane 2,8 vs. 9,6 mois, $p < 0,0001$), ce qui traduit une survie globale également plus courte (médiane 8,0 vs. 23,2 mois, $p < 0,0001$).

4 / Hétérogénéité tumorale au moment de la progression

Le dernier prélèvement effectué sur la série de patients a lieu à la progression de la tumeur, déterminée selon les critères radiologique RECIST.

De l'ADNtc est détecté chez 47 des 66 patients qui progressent, soit 71,2% (Tableau 13). Le nombre de patients avec de l'ADNtc à la progression est nettement supérieur au nombre de patients avec de l'ADNtc à E1. Une des explications serait que la tumeur acquière une résistance au traitement, celui-ci ne faisant plus effet, la masse tumorale grossie et la quantité d'ADNtc lâchée dans la circulation sanguine augmente.

Le temps entre le début du traitement et la progression radiologique à une médiane de 156 jours. Ce temps passe à 139 jours entre le début du traitement et la progression biologique. Le temps moyen entre la progression biologique et radiologique est de 11 jours $\pm$ 9,4 jours (Figure 43). La différence n'est pas significative.

Les mutations retrouvées chez ces 47 patients sont décrites dans la Figure 44.

La majorité de ces mutations étaient déjà présentes dans la tumeur au moment du diagnostic. Cependant, nous notons que de nouvelles mutations apparaissent. Ces mutations acquises sont différentes pour les échantillons avec une mutation *EGFR* initiale et pour ceux sans mutation *EGFR*. La mutation p.T790M est la mutation acquise la plus fréquente pour les échantillons mutés *EGFR*. Elle est connue pour être une mutation de résistance au traitement. Les nouvelles mutations retrouvées dans les échantillons non mutés *EGFR* sont très hétérogènes. Elles se situent sur les gènes *TP53*, *ERBB2*, *PTEN*, *NRAS*, *FGFR3*, *STK11* et *DDR2*.

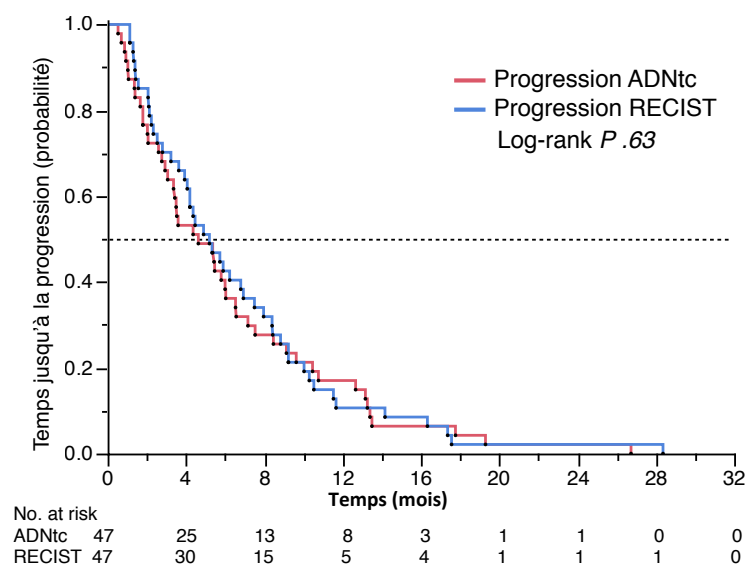


Figure 43 : Détermination du délai de progression depuis T0 déterminée selon les critères RECIST ou l'ADNtc.

Courbe rouge : ADNtc à la progression, courbe bleue : RECIST à la progression. Détermination du délai de progression selon les critères RECIST ou en fonction de la détection d'ADNtc. Chaque point noir correspond à un patient qui progresse.

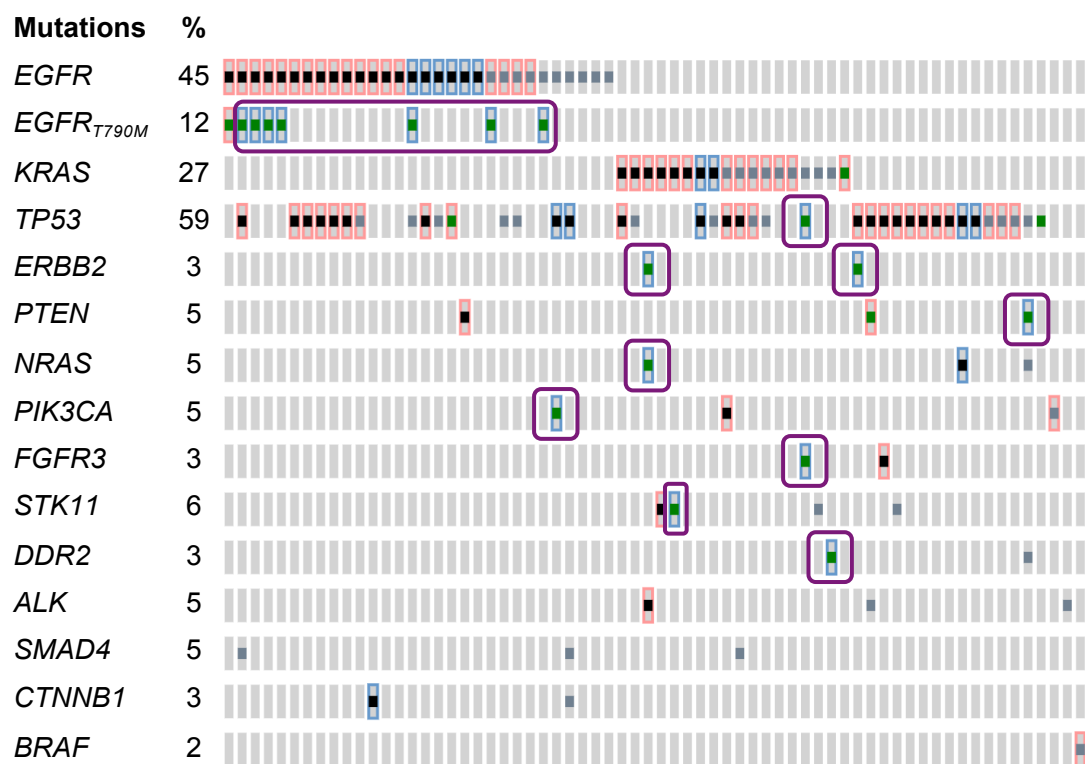


Figure 44 : Evolution du statut mutationnel des ADNtc entre T0 et ToP.

Une colonne représente un patient. Les 66 patients représentés correspondent à la série de patient analysées à la progression. Encadré en rouge : les mutations présentes ou non dans la tumeur mais retrouvées à T0. Encadré en bleu : les mutations présentes ou non dans la tumeur mais non retrouvées à T0. Encadré en violet : les mutations acquises, non présentes dans la tumeur ou à T0 mais présentes à la progression (EGFR p.T790M, TP53, ERBB2, PTEN, NRAS, PIK3CA, FGFR3, DDR2, STK11).

Carré gris : les mutations présentes dans la tumeur mais non retrouvées à T0 et à la progression, mutation décalant le cadre de lecture. Carré vert : mutation faux sens. Carré noir : mutation tronquante.

Cette étude confirme l'intérêt de l'ADNtc pour évaluer l'efficacité du traitement en parallèle du scanner. Nous avons montré que la présence d'ADNtc à la première évaluation (E1) est fortement prédictive de l'efficacité du traitement et impacte la survie sans progression et la survie globale.

Nous avons montré que la proportion de patients présentant de l'ADNtc à la rechute est plus élevée qu'à la première évaluation. La situation la plus fréquente est la réapparition de la mutation initiale. Dans certains cas, de nouvelles modifications qui pourraient être liées à la résistance ont été identifiés.

Lorsque seules les mutations initiales sont identifiées à la rechute nous ne pouvons pas exclure l'existence de nouvelles altérations qui ne seraient pas identifiées par notre panel de gènes. En particulier, des amplifications de gènes sont fréquemment identifiées dans les biopsies de rechute. C'est une limitation de notre technique de ne pas pouvoir identifier ce type (amplifications-délétions) de modifications du profil génétique.

CONCLUSIONS

La prise en charge des patients atteints d'un cancer au stade métastatique passe aujourd'hui par une caractérisation des altérations somatiques tumorales à la recherche d'une cible thérapeutique potentielle.

L'isolement et l'analyse de l'ADN tumoral circulant issu de plasma est susceptible d'être utilisé comme approche non invasive pour détecter ces altérations et les suivre tout au long du traitement. Les résultats analytiques et la sensibilité « individuelle » sont dépendants de l'étape d'extraction qui doit permettre d'isoler efficacement des quantités souvent faibles de matériel et être compatible avec les techniques mises en place en aval. Le choix de la technique d'extraction employée est crucial. Nous avons vu lors de nos tests que plusieurs kits d'extraction ont des performances analytiques identiques mais qu'il était plus ou moins compliqué de mettre en place ces différentes méthodes en routine hospitalière. Certains systèmes ne donnent pas satisfaction dans nos conditions d'analyse et ont été rejetés, en effet l'extraction d'un même échantillon de plasma pouvait donner un rendement d'ADNlc amplifiable très variable d'un kit à l'autre. A l'issue des tests pratiqués dans le cadre de ce travail, il a été au final, fait le choix d'un système simple d'utilisation et compatible avec la routine hospitalière. La technique d'extraction (Maxwell® RSC), est donc utilisée dans le cadre du soin dans le service de biochimie de l'HEGP. L'une des limitations est l'extraction de l'ADNlc à partir de 1mL de plasma ce qui est un petit volume par comparaison aux autres techniques qui pourrait impacter sur la quantité totale d'ADN extraite. L'optimisation du système sur un volume plasmatique de départ plus important apporterait un plus pour les échantillons faiblement concentrés. Nous devons prochainement tester avant commercialisation le kit ccfDNA Plasma de Promega destiné à l'extraction de 2 à 4mL de plasma.

D'autres pistes d'amélioration sont possibles dès l'étape de prélèvement du patient, comme le choix du tube de collecte du sang (EDTA, Streck), le temps d'acheminement du prélèvement au laboratoire, la température de conservation du plasma, le choix des tubes destinés à sa conservation, et peut être même sur la conservation de l'ADNlc.

Il faut souligner que l'absence ou l'extraction d'une très faible quantité d'ADN circulant n'est pas nécessairement due à un problème technique d'extraction mais est une réalité clinique pour certains patients, associée nous l'avons vu à une faible masse tumorale et une survie augmentée.

L'optimisation des techniques d'analyse de l'ADNlc est également indispensable, il faut une méthode sensible et robuste, l'ADNtc étant largement dilué dans l'ADNlc particulièrement dans le cas des cancers pulmonaires. L'utilisation clinique sans a priori de l'ADN tumoral circulant pour caractériser les altérations génétiques de la tumeur exige le développement et la validation de nouvelles méthodes basées sur le séquençage nouvelle génération car la détection est difficile en raison des faibles fréquences alléliques des mutations identifiées. Pour des ratios très bas il est important de ne pas sur-interpréter les résultats de séquençage et de déterminer s'il s'agit d'une vraie mutation, d'un faux positif ou d'une erreur de séquençage.

Nous avons mis en place une nouvelle approche statistique d'analyse des données NGS basée sur la quantification du nombre d'erreur retrouvé sur chacune des bases séquencées (PER-Position Error Rate) à partir d'un ensemble de contrôles négatifs. Pour identifier la mutation, un test binomial est utilisé pour comparer la fréquence de l'allèle mineur mesurée à chaque position dans la série contrôle. Cette méthode est facilement applicable à différents panels Ion Panel AmpliSeq™, elle nécessite d'être adaptée au cas par cas pour s'adapter au panel l'analyse de bruit de fond. La

méthode développée montre une sensibilité et une spécificité similaire à la dPCR sur les échantillons cliniques d'ADNtc (variations de nucléotides simples à 0,3% et insertion/délétion à 0,1%), mais elle a l'avantage d'être plus efficace car elle fournit des données sur une large gamme de mutations en une seule manipulation et à un moindre coût. Cette nouvelle approche permet de réduire les erreurs d'interprétation.

Mais une des limites de la technique est qu'elle détecte toutes les erreurs de la PCR (1 erreur sur 10 000). Cette étape est pourtant indispensable au séquençage NGS avec la technologie AmpliSeq. Pour être encore plus précis dans la détection des mutations, peut être faudrait-il travailler directement sur échantillon d'ADNlc non amplifié ou après amplification par une méthode de type Cold PCR ou le Safe Seq qui minimisent le taux d'erreur mais qui ont un coût très élevé.

Nous avons mis en pratique notre méthode d'analyse BPER sur une série de patients avec un cancer pulmonaire de stade IV. Elle nous a permis de montrer que la détection d'ADNtc via des technologies de séquençage à haut débit est un bon outil pour optimiser les stratégies de traitements, le suivi du patient et pour déterminer son pronostic.

Nous avons montré que l'ADNtc spécifique de la tumeur résiduelle était indépendant de l'évaluation radiologique pour prédire la survie et que la présence d'ADNtc à la première évaluation (E1) à un impact pronostic majeur sur la survie et est prédictive de l'efficacité du traitement.

Nous avons également montré que la quantité d'ADN tumoral circulant est un marqueur pronostique indépendant des altérations moléculaires (voir graphiques en Annexe 10).

Nous avons montré que la proportion de patients présentant de l'ADNtc à la rechute est plus élevée qu'à la première évaluation. La situation la plus fréquente est la réapparition de la mutation initiale. Dans certains cas, de nouvelles modifications qui pourraient être liées à la résistance ont été identifiés. En particulier *ERBB2*, *PIK3CA*, *PTEN*, *NRAS* et *FGFR3* qui témoignent de l'activation possible de voies de signalisation liées à la survie des cellules et à l'inhibition de l'apoptose sans que l'on ait de preuve formelle de leur implication.

Il est intéressant de noter que les patients avec un niveau d'ADNtc indétectable à T0 avaient un pronostic similaire à ceux qui normalise leur ADNtc sous traitement. Ceci suggère que des tumeurs non « sécrétantes » ont un pronostic proche des tumeurs qui répondent à un traitement (thérapie ciblée ou chimiothérapie). Les tumeurs qui ne libèrent pas d'ADNtc pourraient avoir différentes capacités de prolifération et de métastases. Ces tumeurs moins agressives pourraient avoir une histoire plus lente comme en témoigne la meilleure survie des patients.

Nous avons vu que la quantité d'ADNtc est positivement corrélée avec la présence de métastases hépatiques. Deux hypothèses existent d'une part, il s'agit d'un cancer agressif et d'autre part l'absence de membrane basale capillaire au niveau du foie pourrait faciliter la libération de l'ADN tumoral dans la circulation indépendamment de l'agressivité de la maladie.

Des études cliniques interventionnelles sont nécessaires pour montrer que les patients avec de l'ADNtc à E1 doivent bénéficier d'un changement de traitement. L'utilité d'un dosage très précoce (avant 1 mois) devrait être étudiée, car elle permettrait de détecter plus rapidement les patients en progression.

Dans cette étude, l'utilisation du NGS et d'un panel de gènes optimisé permet de doubler le nombre de patients éligibles à un suivi via ADNtc par rapport à l'utilisation des méthodes ciblées sur les mutations hotspots comme la dPCR.

Pour augmenter encore l'informativité du test NGS plasma, l'utilisation d'un panel de gènes plus large peut être proposé. Par exemple, l'ajout de *NF1*, *KEAP1* et *CDKN2A* conduirait à augmenter la

proportion de patients avec une mutation de 88,7% et de 88,8% à 91,7% et 92,1% dans les adénocarcinomes et le carcinome épidermoïde respectivement. D'autant plus que la méthode BPER est applicable à tout PANEL et technologie de séquençage.

Pour conclure, cette étude prospective a montré que l'ADNtc est un outil d'évaluation précoce de la réponse tumoral au traitement dans les CBNPC des patients métastatiques qui mérite d'être validé dans une deuxième étude. Le NGS ciblé et la méthode d'analyse statistique BPER sont aujourd'hui prêts et validés pour une utilisation en clinique précise : au diagnostic pour la recherche d'une cible thérapeutique en l'absence de tissu et dans le cadre du suivi pour identifier une mutation de résistance secondaire aux anti-EGFR.

BIBLIOGRAPHIE

- Barlesi, F., Mazieres, J., Merlio, J.-P., Debieuvre, D., Mosser, J., Léna, H., Ouafik, L., Besse, B., Rouquette, I., Westeel, V., et al. (2016). Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *The Lancet* 387, 1415–1426.
- Beau-Faller, M., Blons, H., Domerg, C., Gajda, D., Richard, N., Escande, F., Solassol, J., Denis, M.G., Cayre, A., Nanni-Metellus, I., et al. (2014). A Multicenter Blinded Study Evaluating EGFR and KRAS Mutation Testing Methods in the Clinical Non-Small Cell Lung Cancer Setting—IFCT/ERMETIC2 Project Part 1. *J. Mol. Diagn.* 16, 45–55.
- Bosc, C., Ferretti, G.R., Cadranet, J., Audigier-Valette, C., Besse, B., Barlesi, F., Decroisette, C., Lantuejoul, S., Arbib, F., and Moro-Sibilot, D. (2015). Rebiopsy during disease progression in patients treated by TKI for oncogene-addicted NSCLC. *Target. Oncol.* 10, 247–253.
- Cadranet, J., Ruppert, A.-M., Beau-Faller, M., and Wislez, M. (2013). Therapeutic strategy for advanced EGFR mutant non-small-cell lung carcinoma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 88, 477–493.
- Cai, X., Janku, F., Zhan, Q., and Fan, J.-B. (2015). Accessing Genetic Information with Liquid Biopsies. *Trends Genet.* 31, 564–575.
- Catarino, R., Coelho, A., Araújo, A., Gomes, M., Nogueira, A., Lopes, C., and Medeiros, R. (2012). Circulating DNA: Diagnostic Tool and Predictive Marker for Overall Survival of NSCLC Patients. *PLoS ONE* 7, e38559.
- Coate, L.E., John, T., Tsao, M.-S., and Shepherd, F.A. (2009). Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* 10, 1001–1010.
- Diaz, L.A., and Bardelli, A. (2014). Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *J. Clin. Oncol.* 32, 579–586.
- Didelot, A., Le Corre, D., Luscan, A., Cazes, A., Pallier, K., Emile, J.-F., Laurent-Puig, P., and Blons, H. (2012). Competitive allele specific TaqMan PCR for KRAS, BRAF and EGFR mutation detection in clinical formalin fixed paraffin embedded samples. *Exp. Mol. Pathol.* 92, 275–280.
- Didelot, A., Kotsopoulos, S.K., Lupo, A., Pekin, D., Li, X., Atochin, I., Srinivasan, P., Zhong, Q., Olson, J., Link, D.R., et al. (2013). Multiplex picoliter-droplet digital PCR for quantitative assessment of DNA integrity in clinical samples. *Clin. Chem.* 59, 815–823.
- Diehl, F., Li, M., Dressman, D., He, Y., Shen, D., Szabo, S., Diaz, L.A., Goodman, S.N., David, K.A., Juhl, H., et al. (2005). Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16368–16373.
- Diehl, F., Schmidt, K., Choti, M.A., Romans, K., Goodman, S., Li, M., Thornton, K., Agrawal, N., Sokoll, L., Szabo, S.A., et al. (2008). Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat. Med.* 14, 985–990.
- Ding, L., Getz, G., Wheeler, D.A., Mardis, E.R., McLellan, M.D., Cibulskis, K., Sougnez, C., Greulich, H., Muzny, D.M., Morgan, M.B., et al. (2008). Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 455, 1069–1075.

- Douillard, J.-Y., Ostoros, G., Cobo, M., Ciuleanu, T., Cole, R., McWalter, G., Walker, J., Dearden, S., Webster, A., Milenkova, T., et al. (2014). Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status. *J. Thorac. Oncol.* 9, 1345–1353.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012. *Int. J. Cancer* 136, E359–E386.
- Gazdar, A.F. (2010). Epidermal growth factor receptor inhibition in lung cancer: the evolving role of individualized therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 37–48.
- Gazdar, A.F., and Thun, M.J. (2007). Lung cancer, smoke exposure, and sex. *J. Clin. Oncol.* 25, 469–471.
- Goldstraw, P., Ball, D., Jett, J.R., Le Chevalier, T., Lim, E., Nicholson, A.G., and Shepherd, F.A. (2011). Non-small-cell lung cancer. *The Lancet* 378, 1727–1740.
- Guérin, S., and Hill, C. (2010). L'épidémiologie des cancers en France en 2010 : comparaison avec les États-Unis. *Bull. Cancer (Paris)* 97, 47–54.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- Holdenrieder, S., and Stieber, P. (2004). Apoptotic markers in cancer. *Clin. Biochem.* 37, 605–617.
- Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F.O., Hesch, R.-D., and Knippers, R. (2001). DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 61, 1659–1665.
- Johnson, B.E., and Jänne, P.A. (2005). Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 65, 7525–7529.
- Kerr, K.M., Bubendorf, L., Edelman, M.J., Marchetti, A., Mok, T., Novello, S., O'Byrne, K., Stahel, R., Peters, S., Felip, E., et al. (2014). Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* 25, 1681–1690.
- Lecomte, T., Berger, A., Zinzindohoué, F., Micard, S., Landi, B., Blons, H., Beaune, P., Cugnenc, P.-H., and Laurent-Puig, P. (2002). Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis: Plasma DNA in Colorectal Cancer Patients. *Int. J. Cancer* 100, 542–548.
- Lecomte, T., Ceze, N., Dorval, é., and Laurent-Puig, P. (2010). Circulating free tumor DNA and colorectal cancer. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 34, 662–681.
- Lee, Y.J., Yoon, K.-A., Han, J.-Y., Kim, H.T., Yun, T., Lee, G.K., Kim, H.Y., and Lee, J.S. (2011). Circulating cell-free DNA in plasma of never smokers with advanced lung adenocarcinoma receiving gefitinib or standard chemotherapy as first-line therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 5179–5187.
- Li, T., Kung, H.-J., Mack, P.C., and Gandara, D.R. (2013). Genotyping and Genomic Profiling of Non-Small-Cell Lung Cancer: Implications for Current and Future Therapies. *J. Clin. Oncol.* 31, 1039–1049.

- Linardou, H., Dahabreh, I.J., Kanakloupiti, D., Siannis, F., Bafaloukos, D., Kosmidis, P., Papadimitriou, C.A., and Murray, S. (2008). Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 9, 962–972.
- Liu, X., Lin, X.J., Wang, C.P., Yan, K.K., Zhao, L.Y., An, W.X., and Liu, X.D. (2014). Association between Smoking and p53 Mutation in Lung Cancer: A Meta-analysis. *Clin. Oncol.* 26, 18–24.
- Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska, F.G., et al. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 350, 2129–2139.
- Marchetti, A., Felicioni, L., Malatesta, S., Grazia Sciarrotta, M., Guetti, L., Chella, A., Viola, P., Pullara, C., Mucilli, F., and Buttitta, F. (2011). Clinical Features and Outcome of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring BRAF Mutations. *J. Clin. Oncol.* 29, 3574–3579.
- Mascaux, C., Iannino, N., Martin, B., Paesmans, M., Berghmans, T., Dusart, M., Haller, A., Lothaire, P., Meert, A.-P., Noel, S., et al. (2005). The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br. J. Cancer* 92, 131–139.
- Meijer, L. (2003). Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncol.-PARIS-* 5, 311–326.
- Milbury, C.A., Zhong, Q., Lin, J., Williams, M., Olson, J., Link, D.R., and Hutchison, B. (2014). Determining lower limits of detection of digital PCR assays for cancer-related gene mutations. *Biomol. Detect. Quantif.* 1, 8–22.
- Mok, T.S., Wu, Y.-L., Thongprasert, S., Yang, C.-H., Chu, D.-T., Saijo, N., Sunpaweravong, P., Han, B., Margono, B., Ichinose, Y., et al. (2009). Gefitinib or carboplatin–paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.* 361, 947–957.
- Pekin, D., Skhiri, Y., Baret, J.-C., Le Corre, D., Mazutis, L., Salem, C.B., Millot, F., El Harrak, A., Hutchison, J.B., Larson, J.W., et al. (2011). Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab. Chip* 11, 2156–2166.
- Perez-Toralla, K., Pekin, D., Bartolo, J.-F., Garlan, F., Nizard, P., Laurent-Puig, P., Baret, J.-C., and Taly, V. (2015). PCR digitale en micro-compartmentes: I. Détection sensible de séquences d'acides nucléiques rares. *Médecine/Sciences* 31, 84–92.
- Qiu, M., Wang, J., Xu, Y., Ding, X., Li, M., Jiang, F., Xu, L., and Yin, R. (2015). Circulating Tumor DNA Is Effective for the Detection of EGFR Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 24, 206–212.
- Schmitt, M.W., Kennedy, S.R., Salk, J.J., Fox, E.J., Hiatt, J.B., and Loeb, L.A. (2012). Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 14508–14513.
- Schwarzenbach, H., Hoon, D.S.B., and Pantel, K. (2011). Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer* 11, 426–437.
- Sequist, L.V., Heist, R.S., Shaw, A.T., Fidias, P., Rosovsky, R., Temel, J.S., Lennes, I.T., Digumarthy, S., Waltman, B.A., Bast, E., et al. (2011a). Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Ann. Oncol.* 22, 2616–2624.
- Sequist, L.V., Waltman, B.A., Dias-Santagata, D., Digumarthy, S., Turke, A.B., Fidias, P., Bergethon, K.,

- Shaw, A.T., Gettinger, S., Cospers, A.K., et al. (2011b). Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Sci. Transl. Med.* 3, 75ra26-75ra26.
- Sharma, S.V., Bell, D.W., Settleman, J., and Haber, D.A. (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 169–181.
- Shepherd, F.A., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., Tan, E.H., Hirsh, V., Thongprasert, S., Campos, D., Maoleekoonpiroj, S., Smylie, M., Martins, R., et al. (2005). Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 353, 123–132.
- Sirera, R. (2001). Circulating DNA is a Useful Prognostic Factor in Patients with Advanced Non-small Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.*
- Solomon, B.J., Mok, T., Kim, D.-W., Wu, Y.-L., Nakagawa, K., Mekhail, T., Felip, E., Cappuzzo, F., Paolini, J., Usari, T., et al. (2014). First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in *ALK*-Positive Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 371, 2167–2177.
- Stroun, M., Lyautey, J., Lederrey, C., Olson-Sand, A., and Anker, P. (2001). About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release. *Clin. Chim. Acta* 313, 139–142.
- Suda, K., Tomizawa, K., and Mitsudomi, T. (2010). Biological and clinical significance of KRAS mutations in lung cancer: an oncogenic driver that contrasts with EGFR mutation. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 49–60.
- Taly, V., Pekin, D., Abed, A.E., and Laurent-Puig, P. (2012). Detecting biomarkers with microdroplet technology. *Trends Mol. Med.* 18, 405–416.
- Taly, V., Pekin, D., Benhaim, L., Kotsopoulos, S.K., Le Corre, D., Li, X., Atochin, I., Link, D.R., Griffiths, A.D., Pallier, K., et al. (2013). Multiplex Picodroplet Digital PCR to Detect KRAS Mutations in Circulating DNA from the Plasma of Colorectal Cancer Patients. *Clin. Chem.* 59, 1722–1731.
- Thierry, A.R., Mouliere, F., El Messaoudi, S., Mollevi, C., Lopez-Crapez, E., Rolet, F., Gillet, B., Gongora, C., Dechelotte, P., Robert, B., et al. (2014). Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat. Med.* 20, 430–435.
- Tissot, C. (2015). Circulating free DNA concentration is an independent prognostic biomarker in lung cancer. *Respir J.*
- Toschi, L., and Cappuzzo, F. (2010). Impact of biomarkers on non-small cell lung cancer treatment. *Target. Oncol.* 5, 5–17.
- Tsui, D.W.Y., and Berger, M.F. (2016a). Profiling Non-Small Cell Lung Cancer: From Tumor to Blood. *Clin. Cancer Res.* 22, 790–792.
- Tsui, D.W.Y., and Berger, M.F. (2016b). Profiling Non-Small Cell Lung Cancer: From Tumor to Blood. *Clin. Cancer Res.* 22, 790–792.
- van der Vaart, M., and Pretorius, P.J. (2008). Circulating DNA. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1137, 18–26.
- Vallée, A., Audigier-Valette, C., Herbreteau, G., Merrien, J., Tessonnier, L., Théoleyre, S., and Denis, M.G. (2016). Rapid clearance of circulating tumor DNA during treatment with AZD9291 of a lung cancer patient presenting the resistance EGFR T790M mutation. *Lung Cancer* 91, 73–74.
- Wong, K.-K. (2008). Searching for a magic bullet in NSCLC: the role of epidermal growth factor receptor mutations and tyrosine kinase inhibitors. *Lung Cancer* 60, Supplement 2, S10–S18.

Yoon, K.-A., Park, S., Lee, S.H., Kim, J.H., and Lee, J.S. (2009). Comparison of Circulating Plasma DNA Levels between Lung Cancer Patients and Healthy Controls. *J. Mol. Diagn.* *11*, 182–185.

Zhong, Q., Bhattacharya, S., Kotsopoulos, S., Olson, J., Taly, V., Griffiths, A.D., Link, D.R., and Larson, J.W. (2011). Multiplex digital PCR: breaking the one target per color barrier of quantitative PCR. *Lab. Chip* *11*, 2167–2174.

Zonta, E., Garlan, F., Pécuchet, N., Perez-Toralla, K., Caen, O., Milbury, C., Didelot, A., Fabre, E., Blons, H., Laurent-Puig, P., et al. (2016). Multiplex Detection of Rare Mutations by Picoliter Droplet Based Digital PCR: Sensitivity and Specificity Considerations. *PLOS ONE* *11*, e0159094.

ANNEXES

Annexe 1 : Liste des ADN utilisés comme contrôle interne.

Provenance ADN	Mutation(s)	Fournisseur
ADN génomique	-	Promega (G3041)
H1975	EGFR : p.L858R, p.T790M	ATCC (CRL-5908)
H1650	EGFR : Del19	ATCC (CRL-5883)
A427	KRAS : p.G12D	ATCC (HTB-53)
Lignée cellulaire immortalisée	KRAS : p.G12R	-
H358	KRAS : p.G12C	ATCC (CRL-5807)
SW620	KRAS : p.G12V	ATCC (CCL-227)
HT-29	BRAF : p.V600E	ATCC (HTB-38)
ADN patient	EGFR : p.L861Q	-
HD200	BRAF: p.V600E. EGFR: p.ΔE746-A750 p.L858R p.T790M p.G719S, KRAS: p.G13D p.G12D, NRAS: p.Q61K, PIK3CA: p.H1047R p.E545K	Horizon Diagnostics™
HD728	BRAF: p.V600E p.V600K, EGFR: p.T790M p.G719S, KRAS: p.G13D p.G12R p.G12A, NRAS: p.Q61K, PIK3CA: p.H1047R	Horizon Diagnostics™
HD780	EGFR: p.T790M p.V769-D770insASV p.L858R p.ΔE746-A750, KRAS: p.G12d, NRAS: p.Q61K p.A59T, PIK3CA: p.E545K	Horizon Diagnostics™

Annexe 2 : Composition du mix de dPCR et liste des réactifs.

Les réactifs sont ajoutés de façon à avoir un volume final de 25µl.

Réactif	Concentration finale	Fournisseur
TaqMan® Genotyping Master Mix	1X	Life Technologies (réf. : 4371355)
dNTPs	1.2 mM	Life Technologies (réf. : R1121)
MgCl ₂	0.5 mM	Life Technologies (réf. : R0971)
Droplet Stabilizer	1X	RainDance Technologies (réf. : 20-00803)
TaqMan® probes	0.2 µM	Life Technologies
Olinucleotide primers	0.8 µM	Life Technologies
castPCR™ probes	1X VIC assay	Life Technologies
castPCR™ probes	1X FAM assay	Life Technologies
ZEN probes	0.2 µM	IDT
Olinucleotide primers	0.4 µM	IDT
Tris-HCl pH8 10 mM	qsp 25µL	Life Technologies (réf. : AM9855G)
ADN (non muté ou muté)	≈ 300 to 800 copies/µL	Promega, ATCC ou ADN patient

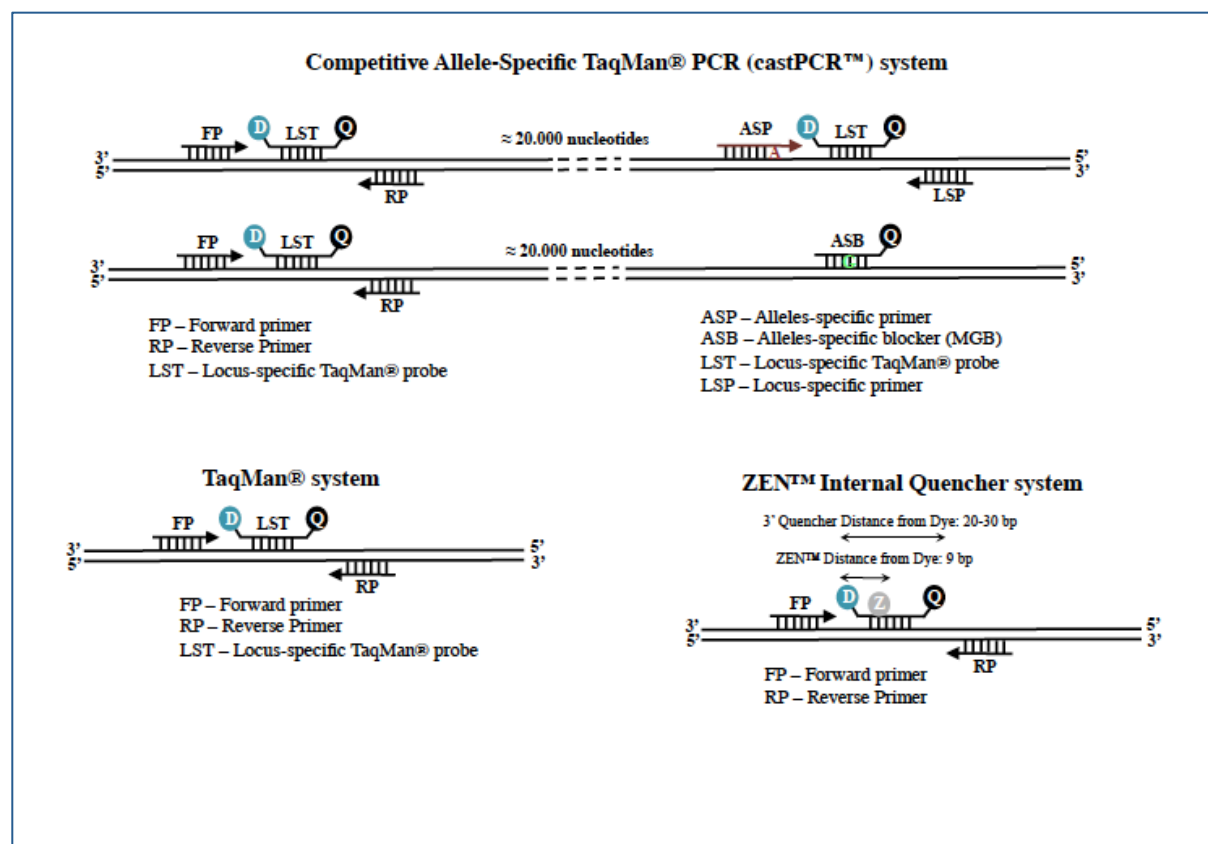
Annexe 3 : Liste des sondes utilisées en dPCR.

Sonde	Technologie	Fournisseur
EGFR Référence	CastPCR™ probes	Life Technologies (réf. : 4465807)
EGFR Del19	CastPCR™ probes	Life Technologies (réf. : 4465805)
EGFR p.L858R	CastPCR™ probes	Life Technologies (réf. : 4465804)
EGFR p.L861Q	CastPCR™ probes	Life Technologies (réf. : 4465804)
EGFR p.T790M	ZEN™ probe	IDT (custom)
KRAS p.G12D	TaqMan® probes	Life Technologies (custom)
KRAS p.G12R	TaqMan® probes	Life Technologies (custom)
KRAS p.G12C	TaqMan® probes	Life Technologies (custom)
KRAS p.G12V	TaqMan® probes	Life Technologies (custom)

Annexe 4 : Conditions de thermocyclage pour la dPCR.

	castPCR™ probes				TaqMan® probes				ZEN™ probes			
	Temp (C°)	Hold	Rampe Rate (°C/s)	Cycles	Temp (C°)	Hold	Rampe Rate (°C/s)	Cycles	Temp (C°)	Hold	Rampe Rate (°C/s)	Cycles
Pre-heating	-	-	-	-	50	2 min	0.6	1	-	-	-	-
Polymerase activation	95	10 min	0.6	1	95	10 min	0.6	1	95	10 min	0.6	1
Denaturation	92	15 s	0.6	5	95	15 s	0.6	45	95	15 s	0.6	45
Annealing & Extension	58	1 min	0.6		64	1 min	0.6		58	15 s	0.6	
Denaturation	92	15 s	0.6	40	-	-	-	-	60	45 s	0.6	-
Annealing & Extension	60	1 min	0.6		-	-	-	-	-	-	-	
Incubation	98	10 min	0.6	1	98	10 min	0.6	1	98	10 min	0.6	1
Cooling	10	10 min	-	1	10	10 min	-	1	10	10 min	-	1

Annexe 5 : Schéma de fonctionnement d'une sonde TaqMan®, CastPCR™ et ZEN.



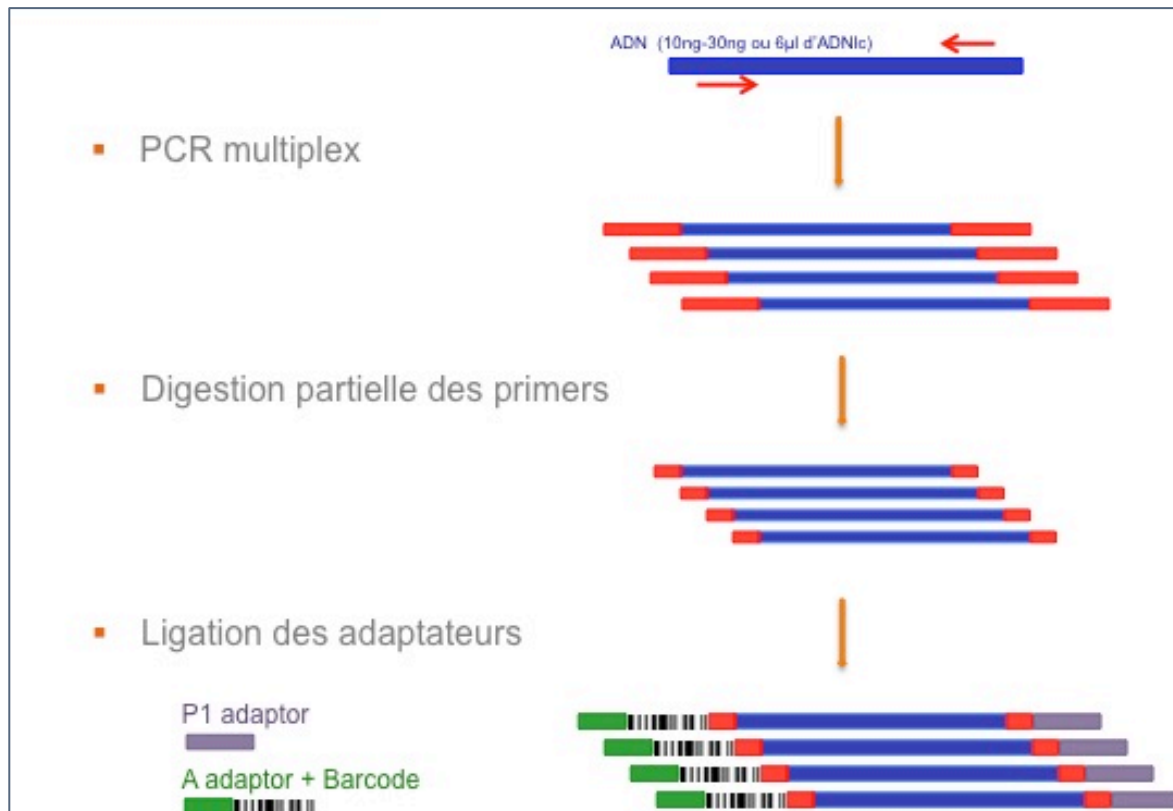
Annexe 6: Fonctionnement du Ion Proton.

Etapes du séquençage:

- préparation des librairies
- purification des ADN
- amplification clonale sur sphère
- enrichissement des sphères positives
- séquençage
- analyse des résultats

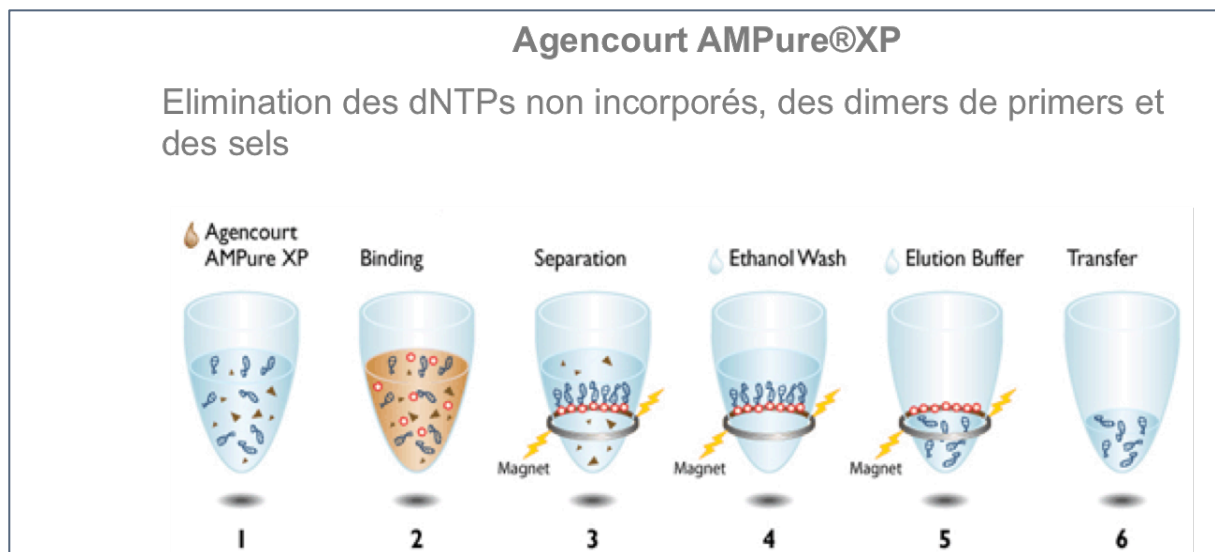


- préparation des librairies



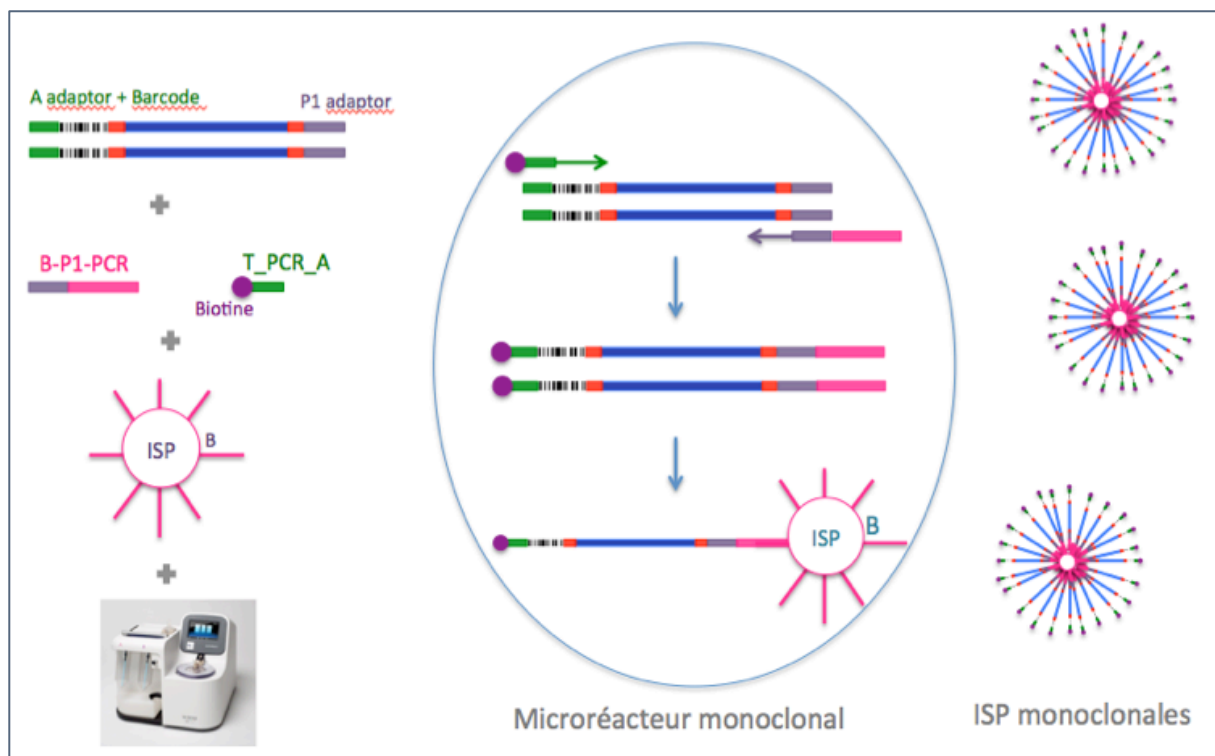
Amplification des séquences d'intérêt par PCR puis digestion partielle des amorces afin d'y associer des adaptateurs. L'adaptateur P1 et l'adaptateur A, lié à un barcode sont fixés sur les amplicons.

- purification des ADN



La purification de l'ADN se fait avec des billes magnétique Agencourt AMPure®XP. L'ADN est capté par les billes et les déchets de PCR éliminés. L'étape suivante consiste à normaliser tous les échantillons à 100 pico molaire avec le kit Ion Library Equalizer™ et à les réunir dans un seul tube : « pool ».

- amplification clonale sur sphère

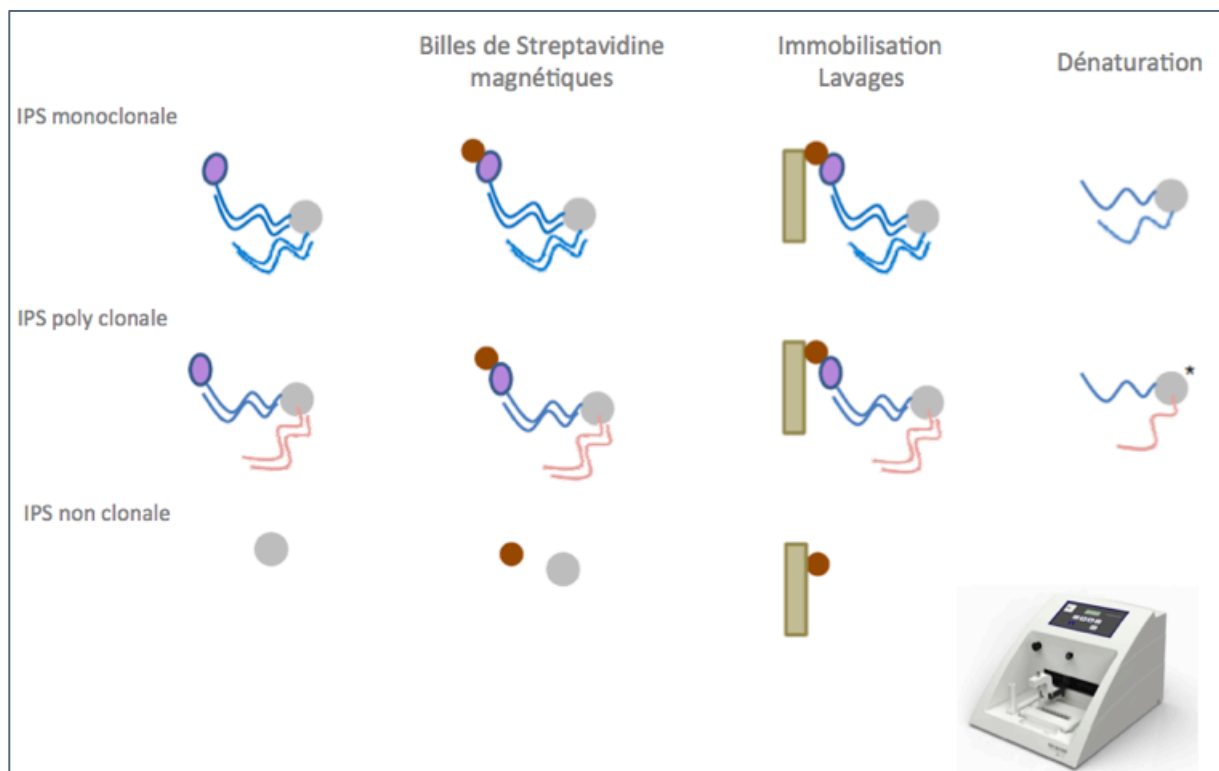


Le but de l'amplification clonale sur sphère est d'obtenir des ISP (Ion Spheres Particle) monoclonales au sein de microréacteurs (1 même amplicon répété plusieurs fois sur une sphère).

Pour faire cette amplification, le « pool » est mélangé avec des ISP et des amorces de PCR (B-P1-PCR et T_PCR_A). Ces amorces vont se fixer sur les amplicons puis le complexe va se fixer aux ISP. Une amplification par PCR est alors réalisée. Ces étapes se déroulent lors d'une réaction en émulsion dans des gouttes d'eau entourées d'huiles (image du centre).

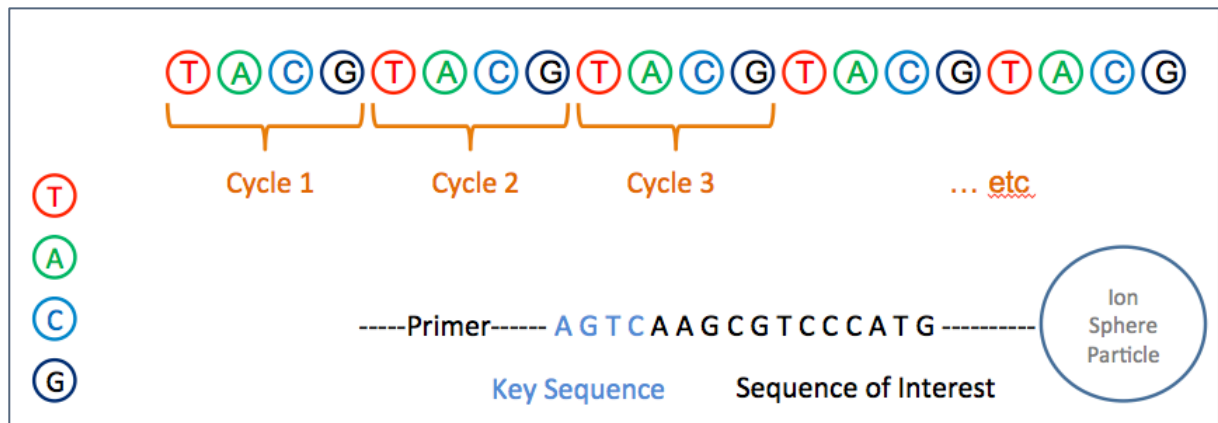
Image de droite : ISP + amplicon amplifié X fois.

- enrichissement des sphères positives



La biotine fixée sur l'amorce T_PCR_A (bille rouge sur le schéma), est captée par des billes de streptavidine magnétiques. Cette étape d'enrichissement permet l'élimination des amorces non utilisées et des sphères sans amplicons.

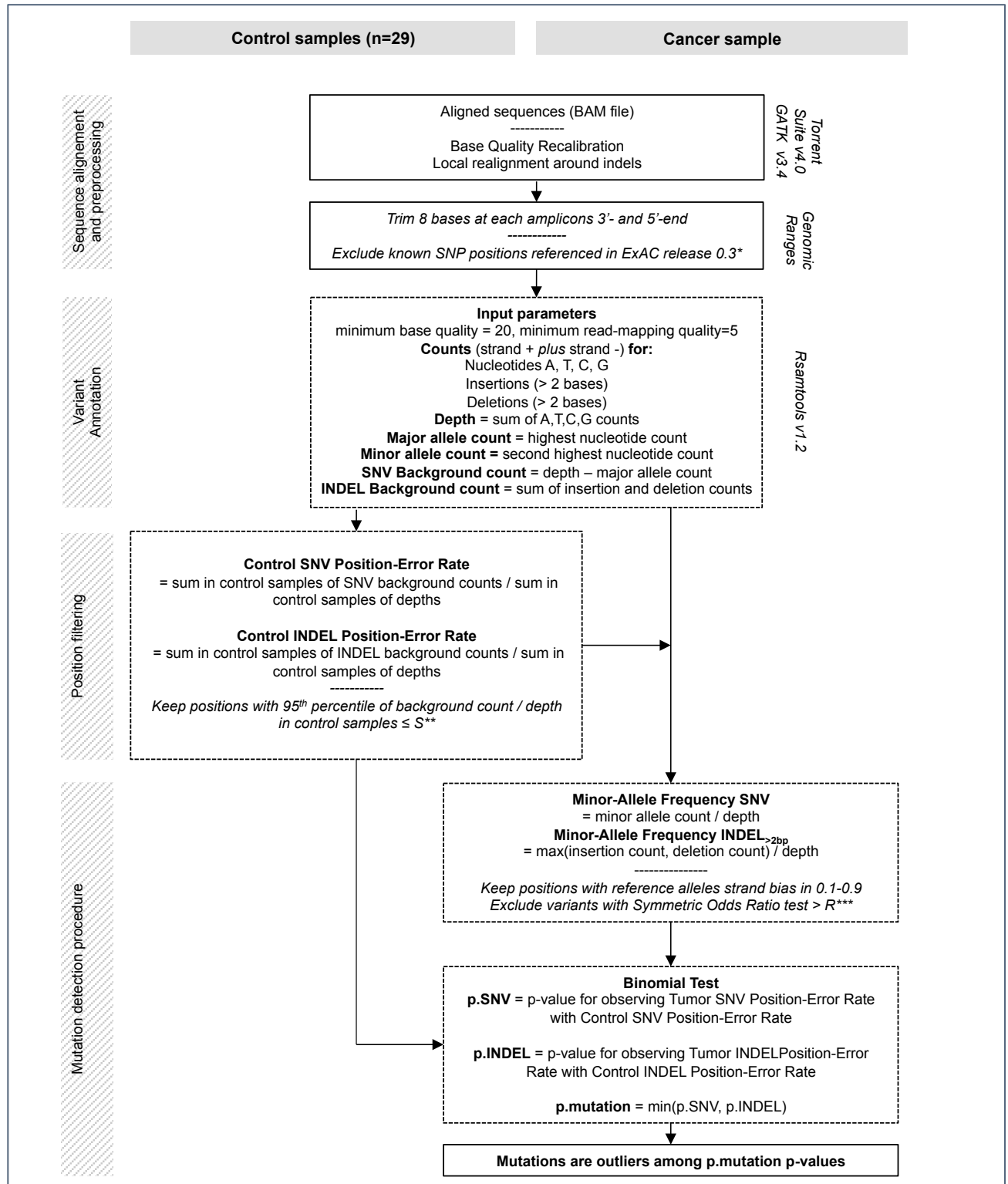
- séquençage



Les ISP sont chargées dans la puce. L'étape de séquençage peut commencer.

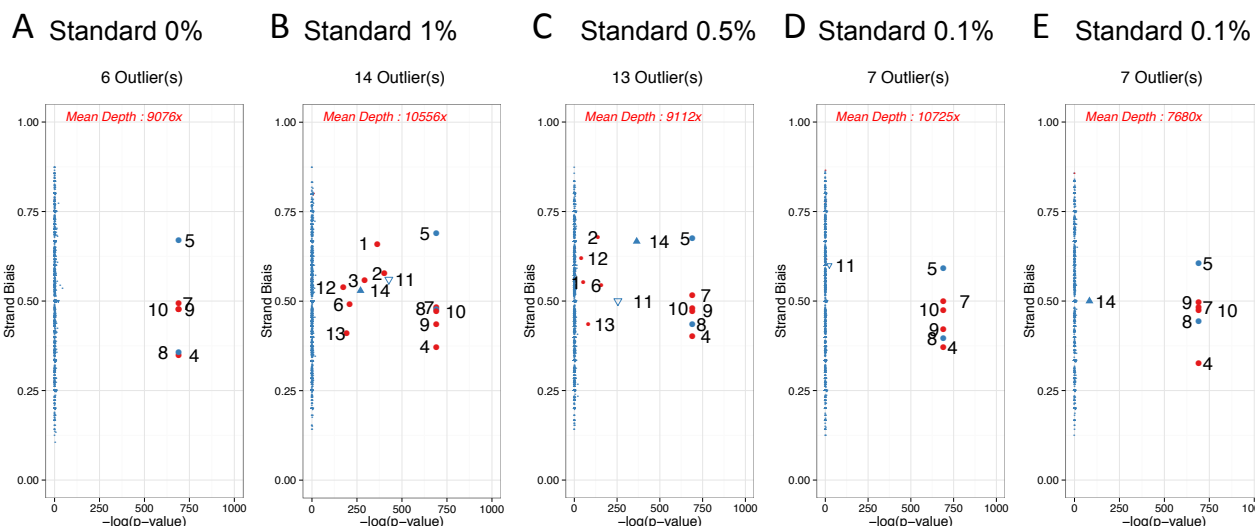
Le pH du Ion Proton™ est réglé sur 7,7, les dNTPs (dCTP, dATP, dGTP, dTTP) et la polymérase de séquençage sont incorporés. A chaque cycles le système propose une base (A, C, G ou T). Si cette base est complémentaire de la base libre sur la séquence d'ADN, elle sera intégrée par l'ADN polymérase. Cette intégration va libérer un proton H⁺. L'appareil va alors mesurer les variations de pH grâce à un nano-pH-mètre et enregistrer la séquence codée.

Annexe 7: Présentation de la technique d'analyse B-PER.



Annexe 8: Analyse par méthode B-PER de l'ADN référence HD780.

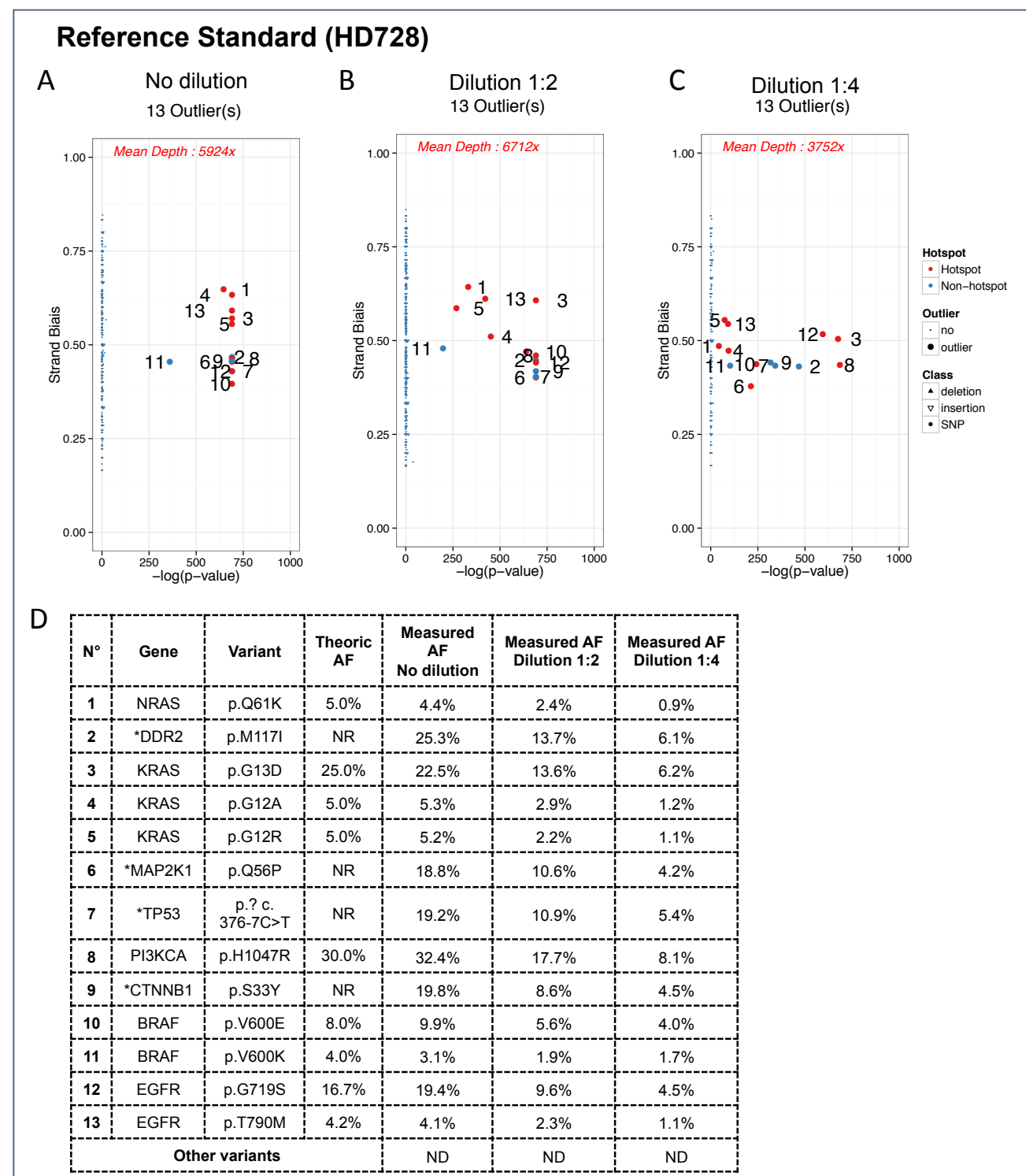
Reference standard (HD780)



F

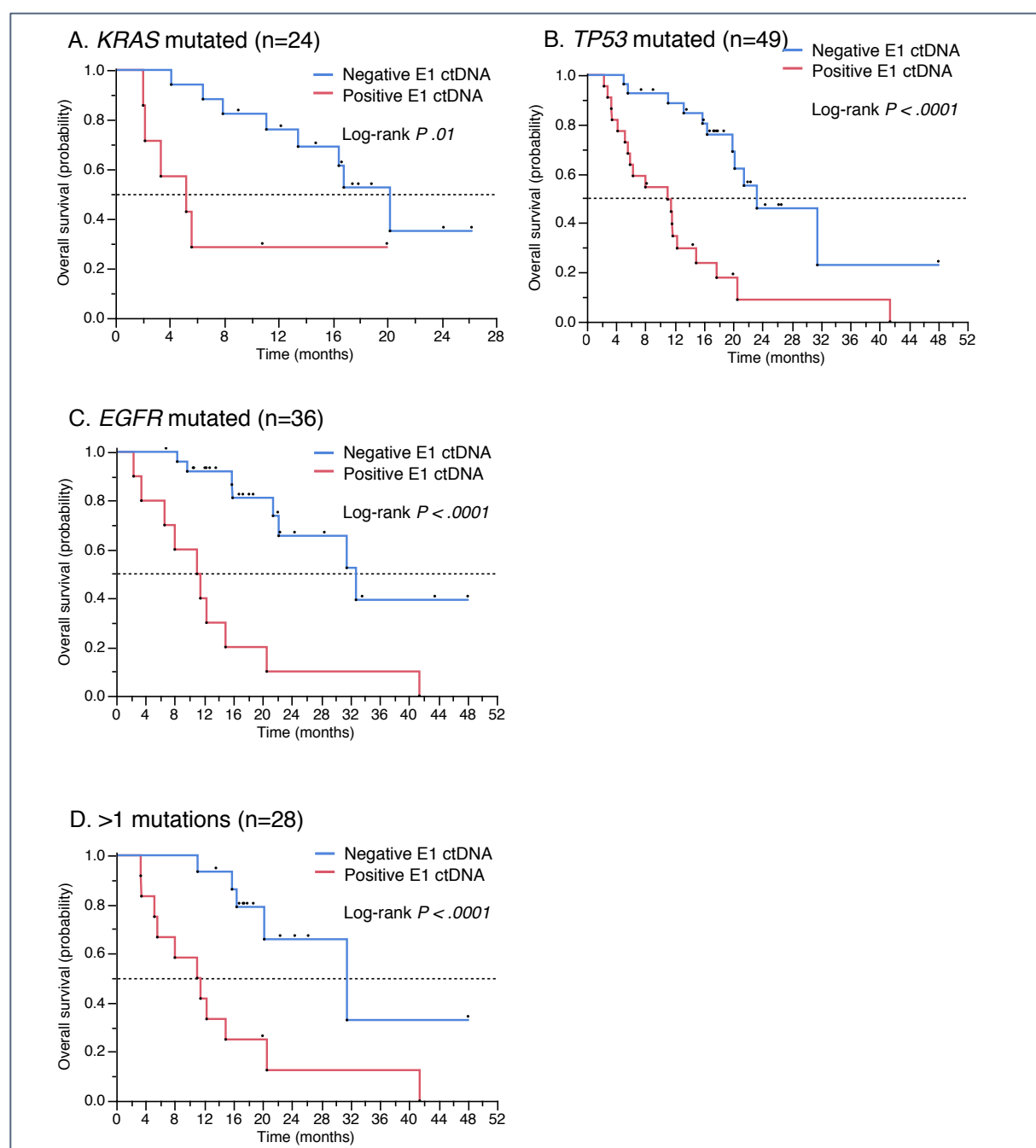
N°	Gene	Variant	Mutation of interest	(a) Measured AF Std 0%	(b) Measured AF Std 1%	(c) Measured AF Std 0.5%	(d) Measured AF Std 0.1%	(e) Measured AF Std 0.1%
1	NRAS	p.Q61K	yes	ND	1.44%	0.49%	ND	ND
2	NRAS	p.A59T	yes	ND	1.41%	0.77%	ND	ND
3	KRAS	p.G12D	yes	ND	1.62%	ND	ND	ND
4	MAP2K1	p.Q56P	no	16.68%	12.03%	8.80%	11.47%	19.17%
5	TP53	p.? c.376-7C>T	no	10.62%	6.74%	7.50%	6.48%	11.66%
6	PIK3CA	p.E545K	yes	ND	1.13%	0.98%	ND	ND
7	PIK3CA	p.H1047R	no	26.44%	27.59%	26.67%	25.43%	26.72%
8	CTNNB1	p.S33Y	no	25.00%	23.58%	28.82%	29.19%	26.49%
9	BRAF	p.V600E	no	30.27%	32.67%	31.84%	32.94%	34.22%
10	EGFR	p.G719S	no	21.54%	20.52%	19.70%	21.07%	19.76%
11	EGFR	p.V769-D770insASV	yes	ND	0.96%	0.62%	0.07%	ND
12	EGFR	p.T790M	yes	ND	0.88%	0.35%	ND	ND
13	EGFR	p.L858R	yes	ND	1.48%	0.93%	ND	ND
14	EGFR	p.E746 -A750del	yes	ND	0.44%	0.65%	ND	0.17%
Other variants			no	ND	ND	ND	ND	ND

Annexe 9: Analyse par la méthode B-PER de l'ADN référence HD728.



Annexe 10 : Pronostique de survie à E1 en fonction du statut mutationnel des patients et de la positivité de l'ADNtc.

- A. patients avec une mutation KRAS (n=24)
- B. patients avec une mutation TP53 (n=49)
- C. patients avec une mutation EGFR (n=36)
- D. patients avec plus de 1 mutation (n=28)



Analysis of Base-Position Error Rate of Next-Generation Sequencing to Detect Tumor Mutations in Circulating DNA

Nicolas Pécuchet,^{1,2} Yves Rozenholc,³ Eleonora Zonta,¹ Daniel Pietraz,¹ Audrey Didelot,¹ Pierre Combe,^{1,2} Laure Gibault,⁴ Jean-Baptiste Bachet,^{1,5} Valérie Taly,¹ Elizabeth Fabre,^{1,2} Hélène Blons,^{1,6} and Pierre Laurent-Puig^{1,6*}

BACKGROUND: Detecting single-nucleotide variations and insertions/deletions in circulating tumor DNA is challenging because of their low allele frequency. The clinical use of circulating tumor DNA to characterize tumor genetic alterations requires new methods based on next-generation sequencing.

METHODS: We developed a method based on quantification of error rate of each base position [position error rate (PER)]. To identify mutations, a binomial test was used to compare the minor-allele frequency to the measured PER at each base position. This process was validated in control samples and in 373 plasma samples from patients with lung or pancreatic cancer.

RESULTS: Minimal mutated allele frequencies were 0.003 for single-nucleotide variations and 0.001 for insertions/deletions. Independent testing performed by droplet digital PCR ($n = 231$ plasma samples) showed strong agreement with the base-PER method ($\kappa = 0.90$).

CONCLUSIONS: Targeted next-generation sequencing analyzed with the base-PER method represents a robust and low cost method to detect circulating tumor DNA in patients with cancer.

© 2016 American Association for Clinical Chemistry

Circulating DNA (1) from cancer patients' plasma or serum may contain tumor DNA (2). Circulating tumor DNA (ctDNA)⁷ is a potential surrogate to undergoing a solid biopsy to detect important theranostic genetic alter-

ations (3). ctDNA may facilitate the study of spatial and temporal heterogeneity of tumors (4, 5) as well as their dynamic evolution during treatment (6, 7). ctDNA can be identified by detecting molecular alterations such as point mutations, small insertions, or small deletions (8).

Detection of ctDNA depends on tumor type and stage. ctDNA has been found in 62% of patients with epidermal growth factor receptor (*EGFR*)⁸-mutated lung cancer (9) and 92% of patients with *KRAS* proto-oncogene, GTPase (*KRAS*)-mutated colon cancer (10). Different methods have been developed to characterize ctDNA using bulk quantitative PCR (11), droplet-based digital PCR (dPCR) (8, 12), and next-generation sequencing (NGS) (13, 14). These methods have different advantages and drawbacks. Optimized quantitative PCR strategies (15) and dPCR methods are analytically sensitive (16). However, these methods can be only used to characterize a limited number of chosen mutations (12).

Targeted NGS has been developed to screen a large number of potential mutations in tumor biopsies (17). The basic NGS workflow is not adapted to reach the ctDNA detection threshold (13, 18) and therefore lacks analytical sensitivity compared to dPCR (19). Indeed, sequencing capability is limited by several issues: (a) depth of sequencing (20), (b) background error noise (21, 22), and (c) the methodological pipeline used to detect mutations (23). To overcome these technical limitations, several attempts have been made using capture technology (24, 25), circle sequencing (26), and by using unique molecular identifiers as in Safe-Sequencing System (Safe-SeqS) (14), duplex (27, 28), and integrated

¹ INSERM UMR-S1147, CNRS SNC 5014, Paris Sorbonne Cité Université, Paris, France—Equipe labellisée Ligue Contre le cancer; ² Department of Medical Oncology, Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; ³ MERIT-UMR IRD 216, Paris Sorbonne Cité Université, Paris, France; ⁴ Department of Pathology, Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; ⁵ Department of Gastro-enterology, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; ⁶ Department of Biochemistry, Pharmacogenetic and Molecular Oncology Unit, Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France.

* Address correspondence to this author at: UMRS-1147, 45 rue des Saints-Pères 75006 Paris. Fax +33-142862072; e-mail pierre.laurent-puig@parisdescartes.fr.
Received April 5, 2016; accepted August 15, 2016.

Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2016.258236

© 2016 American Association for Clinical Chemistry

⁷ Nonstandard abbreviations: ctDNA, circulating tumor DNA; dPCR, digital PCR; NGS, next-generation sequencing; PER, position error rate; AF, allele frequency; BPER, base-PER; SNV, single nucleotide variation; Safe-SeqS, Safe-Sequencing System; INDEL, insertion/deletion; SNP, single nucleotide polymorphism; ctDNA, cell-free DNA; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded; BAM, binary alignment; GATK, Genome Analysis Tool Kit; MAF, minor AF.

⁸ Human genes: *EGFR*, epidermal growth factor receptor; *KRAS*, *KRAS* proto-oncogene, GTPase; *TP53*, tumor protein p53; *ERBB2*, erb-b2 receptor tyrosine kinase 2; *DDR2*, discoidin domain receptor tyrosine kinase 2; *STK11*, serine/threonine kinase 11.

RESEARCH ARTICLE

Base-Position Error Rate Analysis of Next-Generation Sequencing Applied to Circulating Tumor DNA in Non-Small Cell Lung Cancer: A Prospective Study

Nicolas Pécuchet^{1,2}, Eleonora Zonta¹, Audrey Didelot¹, Pierre Combe², Constance Thibault², Laure Gibault³, Camille Lours⁴, Yves Rozenholc⁵, Valérie Taly¹, Pierre Laurent-Puig^{1,4}, Hélène Blons^{1,4}*, Elizabeth Fabre^{1,2}

1 INSERM UMR-S1147, CNRS SNC 5014, Equipe labélisée Ligue Contre le Cancer, Université Sorbonne Paris Cité, Paris, France, **2** Department of Medical Oncology, Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP), Assistance Publique—Hôpitaux de Paris, Paris, France, **3** Department of Pathology, Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP), Assistance Publique—Hôpitaux de Paris, Paris, France, **4** Department of Biochemistry, Pharmacogenetics and Molecular Oncology, Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP), Assistance Publique—Hôpitaux de Paris, Paris, France, **5** MERIT—UMR IRD 216, Université Sorbonne Paris Cité, Paris, France

* These authors contributed equally to this work.

* helene.blons@parisdescartes.fr



 OPEN ACCESS

Citation: Pécuchet N, Zonta E, Didelot A, Combe P, Thibault C, Gibault L, et al. (2016) Base-Position Error Rate Analysis of Next-Generation Sequencing Applied to Circulating Tumor DNA in Non-Small Cell Lung Cancer: A Prospective Study. *PLoS Med* 13(12): e1002199. doi:10.1371/journal.pmed.1002199

Academic Editor: Marc Ladanyi, MSKCC, UNITED STATES

Received: June 30, 2016

Accepted: November 10, 2016

Published: December 27, 2016

Copyright: © 2016 Pécuchet et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The datasets supporting the conclusions of this article have been deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) under the accession code PRJEB17508, <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB17508>. We developed an R package, which contains functions to analyze BAM files of targeted NGS with the BPER method. The package is publicly available under the R package "PlasmaMutationDetector," <https://cran.r-project.org/>. We recommend recalibrating the BAM files with GATK (method

Abstract

Background

Circulating tumor DNA (ctDNA) is an approved noninvasive biomarker to test for the presence of *EGFR* mutations at diagnosis or recurrence of lung cancer. However, studies evaluating ctDNA as a noninvasive "real-time" biomarker to provide prognostic and predictive information in treatment monitoring have given inconsistent results, mainly due to methodological differences. We have recently validated a next-generation sequencing (NGS) approach to detect ctDNA. Using this new approach, we evaluated the clinical usefulness of ctDNA monitoring in a prospective observational series of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC).

Methods and Findings

We recruited 124 patients with newly diagnosed advanced NSCLC for ctDNA monitoring. The primary objective was to analyze the prognostic value of baseline ctDNA on overall survival. ctDNA was assessed by ultra-deep targeted NGS using our dedicated variant caller algorithm. Common mutations were validated by digital PCR. Out of the 109 patients with at least one follow-up marker mutation, plasma samples were contributive at baseline ($n = 105$), at first evaluation ($n = 85$), and at tumor progression ($n = 66$). We found that the presence of ctDNA at baseline was an independent marker of poor prognosis, with a median overall survival of 13.6 versus 21.5 mo (adjusted hazard ratio [HR] 1.82, 95% CI 1.01–3.55, $p = 0.045$) and a median progression-free survival of 4.9 versus 10.4 mo (adjusted HR 2.14, 95% CI 1.30–3.67, $p = 0.002$). It was also related to the presence of bone and liver

Annexe 13 : Poster présenté aux assises de génétique de 2016.

Mise en place d'un système simple et automatisé pour l'extraction de l'ADN circulant

DIDELOT A.¹, GIRAUDET V.², LE HAYE C.², FABLET C.³, LEFEBVRE N.³, SALAUN P.³, BAGINSKI I.³, TALY V.¹, BLONS H.^{1,2}

¹INSERM UMRS 1147/CNRS SNC 5014, 45 rue des Saints Pères, Université Paris Descartes, 75270 PARIS.

²HEGP, Laboratoire de Biochimie, 20-40 rue Leblanc 75908 PARIS.

³PROMEGA France, 24 chemin des Verrières, 69260 Charbonnières-les-Bains



1. Introduction

Depuis les années 1990, il a été montré que de l'ADN double brin circule dans le plasma sous forme libre. Chez les patients atteints de cancer, de l'ADN tumoral peut être mis en évidence. Il porte les anomalies moléculaires présentes dans la tumeur primitive ou dans les métastases, notamment les mutations ponctuelles, translocations, amplifications et méthylations. La capacité à extraire et caractériser cet ADN tumoral circulant (ADNtc) est aujourd'hui un enjeu majeur. En effet la prise en charge des patients atteints de cancers au stade métastatique passe aujourd'hui par une caractérisation des altérations somatiques tumorales à la recherche d'une cible thérapeutique potentielle. En l'absence de tissu, le plasma pourrait se substituer à la biopsie. Enfin, sous traitement, le profil moléculaire change, et conduit à une plus grande hétérogénéité des clones tumoraux et à l'émergence de résistance. Un suivi des profils moléculaires au cours du temps est nécessaire à la prise en charge des patients en reprise évolutive. Les prélèvements sanguins doivent permettre d'éviter la re-biopsie.

Des méthodes d'analyse de biologie moléculaire ont été développées plus spécifiquement pour étudier l'ADN circulant. En effet, le ratio allélique mutant/normal étant très faible dans l'ADN circulant, la technique doit avoir une limite de détection la plus faible possible.

Mais les résultats analytiques sont très dépendants de l'étape d'extraction qui doit permettre d'extraire efficacement des quantités souvent faibles de matériel et être compatible avec les techniques mises en place en aval. Enfin les méthodes d'extraction et de typage de l'ADNtc doivent pouvoir être mises en place facilement dans le cadre du soin courant.

L'utilité en clinique pourrait être très large, du dépistage à la prédiction de l'efficacité d'un traitement et de la reculte sous traitement.

2. Matériel et Méthodes

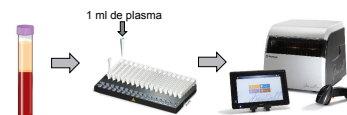
46 plasmas issus de prélèvements de sang sur tubes EDTA ont été étudiés. Les prélèvements ont été préparés par centrifugation (2 fois à 2.000 x g) et les plasmas ont été conservés à -25 °C.

Le système Maxwell® RSC a été utilisé pour purifier l'ADN circulant à partir de plasma avec le kit Maxwell® RSC ccfDNA Plasma kit (réf. AS1480), purification basée sur la technologie de billes paramagnétiques.

La quantification est faite au Qubit® dsDNA HS assay kit.

La PCR digitale a été réalisée à l'aide d'une sonde TaqMan KRAS p.G12C (KRAS gene test) et du système RainDrop (RainDance Technologies).

3. Protocole



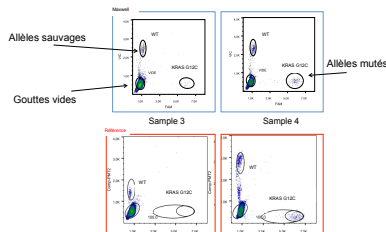
1 ml de plasma est ajouté directement dans la cartouche d'extraction du kit Maxwell® RSC ccfDNA Plasma (réf. AS1480).
Le volume d'élution est de 60 µl.
La durée de l'extraction est de 80 minutes.

4. Détection des mutations par PCR digitale

Concernant la quantité d'ADN extraite mesurée au Qubit® et rapportée à 1ml de plasma, les résultats en technique Maxwell® RSC montre une équivalence ou une supériorité par rapport à la technique manuelle sauf pour 5 échantillons.

Les rendements d'extraction mesurés en ddPCR sont tous supérieurs pour les échantillons extraits avec le Maxwell® RSC (en moyenne 7,6 fois).

Résultats de PCR digitale pour deux échantillons :



www.promega.com

	n	Mutation -	Mutation +	Non interprétable
Méthode de référence du laboratoire	46	25 (54,3%)	17 (36,9%)	4 (8,7%)
Promega Maxwell® RSC ccfDNA Plasma kit	46	25 (54,3%)	21 (45,7%)	0

L'extraction automatisée sur le Maxwell® RSC permet de détecter la mutation recherchée dans 45,7% des échantillons. En comparaison, la méthode d'extraction de référence permet de détecter cette mutation pour 36,9% des mêmes échantillons.

On note 3 discordances :
2 mutés en méthode Maxwell®/ non muté en technique manuelle
1 non muté en méthode Maxwell®/ muté en technique manuelle

Les résultats montrent donc une bonne cohérence des deux méthodes d'extraction.

Aucun échec d'amplification n'a été constaté avec les échantillons extraits avec le Maxwell® RSC, 4 échantillons n'ont pas permis d'obtenir d'amplification avec la méthode de référence.

5. Conclusions

L'ADNtc extrait à partir de 1ml de plasma avec la méthode semi-automatisée Maxwell® RSC permet d'obtenir de bons résultats de typage dans cette série de plasmas par comparaison à une méthode manuelle qui sert de référence.

Le typage sur 1ml peut être néanmoins limitant pour les prélèvements peu concentrés. L'optimisation du système sur un volume plasmatique de départ plus important apporterait un plus pour ces échantillons limites.

Au total, les performances, la facilité d'utilisation du kit et la semi-automatisation de la méthode sont des points importants dans le cadre de la mise en place de ces tests en pratique de soin. Ce système répond bien aux objectifs fixés, il permet en outre de gérer l'urgence et d'organiser les extractions en séries ou en individuelles sans interférer sur l'organisation du travail au laboratoire.

Sur la base de ces premiers résultats encourageants, d'autres évaluations sont et seront réalisées dans d'autres laboratoires.

02/2016

Supportfr@promega.com

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Place de l'ADN tumoral circulant dans la prise en charge des patients atteints d'une tumeur pulmonaire : impact pronostique et suivi dynamique de l'évolution des altérations génétiques au cours du traitement

**DIDELOT Audrey
9 mars 2017**

RÉSUMÉ

L'incidence globale et la mortalité dues au cancer bronchique font de cette pathologie un problème majeur de santé publique. Avec plus de 30 000 nouveaux cas par an en France, il représente la première cause de mortalité par cancer chez l'homme et la troisième chez la femme. Le pronostic de ces patients demeure sombre : la survie relative à 5 ans est estimée à 15% tous stades confondus.

La prise en charge des patients atteints d'un cancer au stade métastatique passe aujourd'hui par une caractérisation des altérations somatiques tumorales à la recherche d'une cible thérapeutique potentielle.

L'isolement et l'analyse de l'ADN tumoral circulant (ADNtc) issu de plasma est susceptible d'être utilisé comme approche non invasive pour détecter ces altérations et les suivre tout au long du traitement. Les résultats analytiques et la sensibilité « individuelle » sont dépendants de l'étape d'extraction qui doit permettre d'isoler efficacement des quantités souvent faibles de matériel. Le choix de la technique d'extraction employée est crucial. Nous avons vu lors de nos tests que plusieurs kits d'extraction ont des performances analytiques identiques mais qu'il était plus ou moins compliqué de mettre en place ces différentes méthodes en routine hospitalière.

L'optimisation des techniques d'analyse de l'ADNtc est également indispensable : il faut une méthode sensible et robuste, l'ADNtc étant largement dilué dans l'ADN libre circulant particulièrement dans le cas des cancers pulmonaires. L'utilisation clinique sans a priori de l'ADNtc pour caractériser les altérations génétiques de la tumeur exige le développement et la validation de nouvelles méthodes basées sur le séquençage nouvelle génération (NGS). Nous avons mis en place une nouvelle approche statistique d'analyse de ces données basée sur la quantification du nombre d'erreur retrouvé sur chacune des bases séquencées (PER-Position Error Rate). Sa sensibilité de détection sur les échantillons cliniques d'ADNtc est de 0,3% pour les variations de nucléotides simples et de 0,1% pour les insertion / délétion de plus de trois paires de bases.

Nous avons mis en pratique notre méthode d'analyse BPER sur une cohorte de patients avec un cancer pulmonaire de stade IV. Cette étude prospective a montré que l'ADNtc est un outil d'évaluation précoce de la réponse tumorale au traitement dans les CBNPC chez les patients métastatiques. Le NGS ciblé et la méthode d'analyse statistique BPER sont aujourd'hui prêts et validés pour une utilisation en clinique précise : au moment du diagnostic pour la recherche d'une cible thérapeutique en l'absence de tissu et dans le cadre du suivi pour identifier une mutation de résistance secondaire aux anti-EGFR.

MOTS CLÉS : CBNPC, ADN tumoral circulant, NGS, BPER, dPCR, pronostique