



HAL
open science

Étude ID-MUT : mise en place de la détermination des mutations de l'EGFR par technique Idylla™ dans le cancer du poumon : évaluation chez 225 patients du CHU de Caen et du Centre de Lutte Contre le Cancer François Baclesse de Caen

Adèle Riot

► **To cite this version:**

Adèle Riot. Étude ID-MUT : mise en place de la détermination des mutations de l'EGFR par technique Idylla™ dans le cancer du poumon : évaluation chez 225 patients du CHU de Caen et du Centre de Lutte Contre le Cancer François Baclesse de Caen. Médecine humaine et pathologie. 2021. dumas-03572453

HAL Id: dumas-03572453

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03572453>

Submitted on 14 Feb 2022

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.

UNIVERSITÉ de CAEN NORMANDIE

UFR SANTÉ

FACULTÉ de MÉDECINE

Année 2020/2021

THÈSE POUR L'OBTENTION
DU GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement le 8 octobre 2021

par

Mme RIOT Adèle
Née le 21/10/1992 à Ploemeur (56)

TITRE DE LA THÈSE :

ETUDE ID-MUT : Mise en place de la détermination des mutations de l'EGFR par technique Idylla™ dans le cancer du poumon - évaluation chez 225 patients du CHU de Caen et du Centre de Lutte Contre le Cancer François Baclesse de Caen.

Président : Monsieur le Professeur Frédéric BIBEAU

Membres : Monsieur le Professeur Emmanuel BERGOT
Madame la Professeure Guénaëlle LEVALLET
Monsieur le Docteur Simon DESHAYES
Monsieur le Docteur Bastien JEAN-JACQUES

Co-Directeurs de thèse : Pr Guénaëlle LEVALLET et Pr Frédéric BIBEAU

Année Universitaire 2020/2021**Doyen**

Professeur Emmanuel TOUZÉ

Assesseurs

Professeur Paul MILLIEZ (pédagogie)

Professeur Guy LAUNOY (recherche)

Professeur Sonia DOLLFUS & Professeur Evelyne EMERY (3^{ème} cycle)**Directrice administrative**

Madame Sarah CHEMTOB

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

M.	AGOSTINI Denis	Biophysique et médecine nucléaire
M.	AIDE Nicolas	Biophysique et médecine nucléaire
M.	ALEXANDRE Joachim	Pharmacologie clinique
M.	ALLOUCHE Stéphane	Biochimie et biologie moléculaire
M.	ALVES Arnaud	Chirurgie digestive
M.	AOUBA Achille	Médecine interne
M.	BABIN Emmanuel	Oto-Rhino-Laryngologie
M.	BÉNATEAU Hervé	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
M.	BENOIST Guillaume	Gynécologie - Obstétrique
M.	BERGER Ludovic	Chirurgie vasculaire
M.	BERGOT Emmanuel	Pneumologie
M.	BIBEAU Frédéric	Anatomie et cytologie pathologique
Mme	BRAZO Perrine	Psychiatrie d'adultes
M.	BROUARD Jacques	Pédiatrie
M.	BUI Thanh-huy Eric	Psychiatrie d'adultes
M.	BUSTANY Pierre	Pharmacologie
Mme	CHAPON Françoise	Histologie, Embryologie
Mme	CLIN-GODARD Bénédicte	Médecine et santé au travail
M.	DAMAJ Ghandi Laurent	Hématologie
M.	DAO Manh Thông	Hépatologie-Gastro-Entérologie
M.	DEFER Gilles	Neurologie
M.	DELAMILLIEURE Pascal	Psychiatrie d'adultes

M. DENISE Pierre	Physiologie
Mme DOLLFUS Sonia	Psychiatrie d'adultes
Mme DOMPMARTIN-BLANCHÈRE Anne	Dermatologie
M. DREYFUS Michel	Gynécologie - Obstétrique
M. DU CHEYRON Damien	Réanimation médicale
Mme ÉMERY Evelyne	Neurochirurgie
M. ESMAIL-BEYGUI Farzin	Cardiologie
Mme FAUVET Raffaèle	Gynécologie – Obstétrique
M. FISCHER Marc-Olivier	Anesthésiologie et réanimation
M. GÉRARD Jean-Louis	Anesthésiologie et réanimation
M. GUÉNOLÉ Fabian	Pédopsychiatrie
Mme GUITTET-BAUD Lydia	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
M. HAMON Martial	Cardiologie
Mme HAMON Michèle	Radiologie et imagerie médicale
M. HANOUIZ Jean-Luc	Anesthésie et réa. médecine péri-opératoire
M. HITIER Martin	Anatomie –ORL Chirurgie Cervico-faciale
M. HULET Christophe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
M. ICARD Philippe	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
M. JOIN-LAMBERT Olivier	Bactériologie - Virologie
Mme JOLY-LOBBEDEZ Florence	Cancérologie
M. JOUBERT Michael	Endocrinologie
M. LAUNOY Guy	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
M. LE HELLO Simon	Bactériologie-Virologie
Mme LE MAUFF Brigitte	Immunologie
M. LOBBEDEVZ Thierry	Néphrologie
M. LUBRANO Jean	Chirurgie viscérale et digestive
M. MAHE Marc-André	Cancérologie
M. MANRIQUE Alain	Biophysique et médecine nucléaire
M. MARCÉLLI Christian	Rhumatologie
M. MARTINAUD Olivier	Neurologie
M. MAUREL Jean	Chirurgie générale
M. MILLIEZ Paul	Cardiologie

M. MOREAU Sylvain	Anatomie/Oto-Rhino-Laryngologie
M. MOUTEL Grégoire	Médecine légale et droit de la santé
M. NORMAND Hervé	Physiologie
M. PARIENTI Jean-Jacques	Biostatistiques, info. médicale et tech. de communication
M. PELAGE Jean-Pierre	Radiologie et imagerie médicale
Mme PIQUET Marie-Astrid	Nutrition
M. QUINTYN Jean-Claude	Ophtalmologie
Mme RAT Anne-Christine	Rhumatologie
M. REPESE Yohann	Hématologie
M. REZNIK Yves	Endocrinologie
M. ROD Julien	Chirurgie infantile
M. ROUPIE Eric	Médecine d'urgence
Mme THARIAT Juliette	Radiothérapie
M. TILLOU Xavier	Urologie
M. TOUZÉ Emmanuel	Neurologie
Mme VABRET Astrid	Bactériologie - Virologie
M. VERDON Renaud	Maladies infectieuses
Mme VERNEUIL Laurence	Dermatologie
M. VIVIEN Denis	Biologie cellulaire

PROFESSEURS ASSOCIÉS DES UNIVERSITÉS A MI-TEMPS

Mme BELLOT Anne	Pédiatrie
M. DE LA SAYETTE Vincent	Neurologie
M. GUILLAUME Cyril	Médecine palliative
M. LE BAS François	Médecine Générale
M. SABATIER Rémi	Cardiologie

PRCE

Mme LELEU Solveig	Anglais
--------------------------	---------

PROFESSEURS ÉMÉRITES

M. DERLON Jean-Michel	Neurochirurgie
M. GUILLOIS Bernard	Pédiatrie

M. HABRAND Jean-Louis	Cancérologie option Radiothérapie
M. HURAUULT de LIGNY Bruno	Néphrologie
Mme KOTTLER Marie-Laure	Biochimie et biologie moléculaire
M. LE COUTOUR Xavier	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
M. LEPORRIER Michel	Hématologie
M. RAVASSE Philippe	Chirurgie infantile
M. TROUSSARD Xavier	Hématologie
M. VIADER Fausto	Neurologie

Année Universitaire 2020/2021**Doyen**

Professeur Emmanuel TOUZÉ

Assesseurs

Professeur Paul MILLIEZ (pédagogie)

Professeur Guy LAUNOY (recherche)

Professeur Sonia DOLLFUS & Professeur Evelyne EMERY (3^{ème} cycle)**Directrice administrative**

Madame Sarah CHEMTOB

**MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS
HOSPITALIERS**

Mme BENHAÏM Annie	Biologie cellulaire
M. BESNARD Stéphane	Physiologie
Mme BONHOMME Julie	Parasitologie et mycologie
M. BOUVIER Nicolas	Néphrologie
M. BROSSIER David	Pédiatrie
M. COULBAULT Laurent	Biochimie et Biologie moléculaire
M. CREVEUIL Christian	Biostatistiques, info. médicale et tech. de communication
M. DE BOYSSON Hubert	Médecine interne
Mme DINA Julia	Bactériologie - Virologie
Mme DUPONT Claire	Pédiatrie
M. ÉTARD Olivier	Physiologie
M. GABEREL Thomas	Neurochirurgie
M. GRUCHY Nicolas	Génétique
M. ISNARD Christophe	Bactériologie Virologie
M. JUSTET Aurélien	Pneumologie
Mme KRIEGER Sophie	Pharmacie
M. LEGALLOIS Damien	Cardiologie
Mme LELONG-BOULOUARD Véronique	Pharmacologie fondamentale
Mme LEVALLET Guénaëlle	Cytologie et Histologie
M. MACREZ Richard	Médecine d'urgence

M. MITTRE Hervé	Biologie cellulaire
M. MOLIN Arnaud	Génétique
M. SAINT-LORANT Guillaume	Pharmacie
M. SESBOÛÉ Bruno	Physiologie
M. TOUTIRAIS Olivier	Immunologie
M. VEYSSIERE Alexis	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie

MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

M. HUMBERT Xavier

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIÉS DES UNIVERSITÉS A MI-TEMPS

Mme ABBATE-LERAY Pascale	Médecine générale
M. BANSARD Mathieu	Médecine générale
M. COUETTE Pierre-André	Médecine générale
Mme NOEL DE JAEGHER Sophie	Médecine générale
M. PITHON Anni	Médecine générale
M. SAINMONT Nicolas	Médecine générale
Mme SCHONBRODT Laure	Médecine générale

MAITRES DE CONFERENCES ÉMÉRITES

Mme DEBRUYNE Danièle	Pharmacologie fondamentale
Mme DERLON-BOREL Annie	Hématologie
Mme LEPORRIER Nathalie	Génétique

Remerciements

Je tiens à remercier très sincèrement :

Monsieur le Professeur Frédéric BIBEAU
Professeur d'Anatomie et Cytologie Pathologiques

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse.
Pour votre enseignement et vos conseils dans la réalisation de ce travail et tout au long de l'internat.
Veuillez recevoir l'expression de ma sincère reconnaissance.

Madame la Professeure Guénaëlle LEVALLET
Professeur d'Histologie et coordinatrice de la structure fédérative MOCAE.

Tu m'as fait l'honneur d'encadrer cette thèse.
Je te remercie très sincèrement pour ta disponibilité, ta relecture, tes conseils et ton écoute dans la réalisation de ce travail.

Monsieur le Professeur Emmanuel BERGOT
Professeur de Pneumologie

Vous m'avez fait l'honneur de juger cette thèse,
Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Docteur Simon DESHAYES
Praticien hospitalier en Pneumologie.

Vous m'avez fait l'honneur de juger cette thèse,
Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Docteur Bastien JEAN-JACQUES
Assistant universitaire et hospitalier en Pathologie.

Tu m'as fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse.
Je te remercie pour tes précieux conseils et le partage de tes connaissances tout au long de mon internat en tant que co-interne puis en tant qu'assistant.

Un grand merci à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail :

A toute l'équipe de la plateforme de Biologie Moléculaire du laboratoire de pathologie du CHU de Caen puis de la structure fédérative MOCAE et en particulier au Dr Nicolas RICHARD et aux techniciennes Sylvie LECOT-COTIGNY, Géraldine LEFEVRE et Roselyne PATEY, pour vos explications sur la biologie moléculaire.

Aux équipes de pneumologie du CHU de Caen et du Centre François Baclesse en particulier au Docteur Youssef OULKHOUIR et au Docteur Radj GERVAIS.

A tous les médecins pathologistes du CHU de Caen et du Centre François Baclesse en particulier au Dr Marie-Laure QUINTYN-RANTY, au Dr Bastien JEAN-JACQUES, au Dr Gaétane PLANCHARD, au Dr François COMOZ, au Dr Fatemeh DUBOIS, au Dr Cécile BLANC-FOURNIER et au Dr Marine DORBEAU pour votre aide.

A Constance PETITEAU pour cette collaboration depuis le début de l'étude, merci pour ton aide précieuse concernant la clinique. Ce fut un plaisir de travailler avec toi. Je te souhaite beaucoup de satisfaction dans ta vie privée et professionnelle future. `

A toutes les techniciennes et secrétaires du laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU de CAEN et du Centre François Baclesse. En particulier à Marie-Christine PETIT et Céline FLEURIE pour votre aide technique.

A l'ensemble des médecins que j'ai eu la chance de croiser tout au long de ma formation, en particulier :

Monsieur le Professeur Pierre ROUSSELOT, pour votre accueil, votre riche enseignement et votre gentillesse qui me seront d'une aide précieuse pour mes débuts d'assistantat !

Madame le Docteur Cécile BLANC-FOURNIER, pour ton enseignement et ta sincère bienveillance, qui me seront d'une aide précieuse pour mes débuts d'assistantat !

Madame le Docteur Cécile BAZILLE, pour ton soutien dans mon travail, ton riche enseignement, ton écoute et ta disponibilité tout au long de mon internat.

Madame le Docteur Marie-Laure QUINTYN-RANTY, pour ta rigueur enseignée, ton écoute et surtout ta grande sympathie dont j'espère encore profiter à l'avenir.

Monsieur François COMOZ pour ton enseignement et ta sympathie apportée tout le long de ma formation à Caen.

Monsieur le Docteur Francisco LLAMAS GUTIERREZ, pour m'avoir en premier familiarisé à la pathologie et m'avoir donné envie de devenir pathologiste !

Madame le Docteur Gaétane PLANCHARD, le Docteur Coralie DAUGE et le Docteur Marie ROSSATO pour votre riche enseignement, votre sympathie, et vos bons conseils.

Aux pathologistes du cabinet Saint-Louis, le Dr Marine DOXAT, le Dr Leslie HEUZE, le Dr François PETIT, le Dr Antoine AUGUSTIN, le Dr Mathieu CAPOVILLA et le Dr Diana SCRUMEDA, merci pour votre compagnonnage et votre riche enseignement.

Monsieur le Docteur Gilles KERNER et le Docteur Nathalie KERNER de m'avoir accueilli et enseigné une médecine générale de qualité et de m'avoir guidé dans mes choix professionnels.

A Caroline de m'avoir soutenue, guidée et surtout de m'avoir motivée et donnée confiance de sauter dans le grand bain de l'internat.

A tous mes co-internes, Céline, Mounia, Frédéric, Marine, David, Bastien, Maxime F, Oriane, Marie, Anne-Laure, Marc, Audrey, Camille pour votre bonne humeur et tous ces bons moments passés ensemble. Et plus particulièrement à Alexandre, Arthur, Félix, Maxime M, Ruben et Gauthier pour votre aide, votre générosité et toutes vos intentions pour le petit être qui pousse pendant ce dernier semestre ! Je garderai de vous le souvenir d'une grande fratrie !!!

A mes parents, Malou et Patrick. Merci à vous deux pour tout le soutien apporté lors de toutes mes années d'études et tout l'amour qui m'ont permis d'être là aujourd'hui. Maman pour tes cours de yoga si précieux et Papa pour tes conseils en bricolage. Je suis fière de vous et vous serai toujours reconnaissante.

A mes deux grandes sœurs, Mathilde et Alice qui m'ont toujours épaulée et soutenue pendant toutes mes années d'études, en particulier Mathilde : je garde un excellent souvenir de tes visites réconfortantes en première année et Alice pour tes explications pédagogiques et la confiance que tu m'as transmise pour les concours. Je suis fière de vous, je vous aime fort.

A mon grand frère, François, mon allié et mon confident étant petite. Merci pour ton soutien et continue à être tel que tu es, si cultivé, si généreux et drôle. Je t'aime fort. Je tiens également à vous remercier, Céline et toi pour les corrections d'anglais.

A Emina, ma grande sœur de cœur, merci de m'avoir soutenue et de m'avoir donné, dès ma petite enfance, la curiosité scientifique.

A mes grands-parents, Mamie et Papi, pour tous les souvenirs d'enfance qui resteront gravés (la caravane, la pêche aux bigorneaux, l'accueil chaleureux à toute heure, le pain brioché, les crêpes, les bons petits plats de Mamie, toutes les anecdotes de votre jeunesse !!!) et pour tout votre amour de grands-parents ! Je vous aime et pense bien à vous.

A ma cousine Morgane avec qui j'ai grandi et avec qui je suis heureuse de passer toujours d'aussi bons moments !! Je t'aime.

A mes chères colocs et amies, Audrey, Marine, Emmanuelle et plus particulièrement à Claire pour m'avoir égayée, soutenue, motivée pendant notre première année !

A mes amis du lycée, Bérénice, Julia, Pauline et Clément. Pour votre amitié sincère et infaillible depuis 14 ans et pour les FILs !! Je vous aime restez comme vous êtes.

A mes Compamours, Ophélie, Claire, Marine et Jean. Pour tous ces étés, vacances et we passés ensemble, on a grandi ensemble et notre amitié est précieuse ! Hâte de vous retrouver !

Aux midinettes, Jeanne, Mathilde, Louise, Manon, Anne-Laure, Claire, Céline, Chloé, Lise et Charlotte. Pour les après-midi BU, les soirées, le ski, Berlin et les longues discussions médicales

A mes amis de Caen, Cyril, Elyse, Erika, Juliette, Servane et Yolaine, pour tous ces bons moments passés ensemble, à boire, manger et à profiter des bords de mer.

Et enfin à Kevin, pour tout le bonheur que tu m'offres au quotidien. Comment te remercier assez pour m'avoir soutenue, pour ta patience, tes encouragements !! Je te dédie ce travail avec tout mon amour...

Abréviations

ADK : Adénocarcinome
ADN : Acide désoxyribonucléique
ALK : Anaplastic lymphoma kinase
AMP : Association for Molecular Pathology
APHP : Assistance publique des Hôpitaux de Paris
ARN : Acide ribonucléique
ASCO : American Society of Clinical Oncology
ATP : Adénosine triphosphate
CAP : College of American Pathologists
CBPNPC : Cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules
CE : Carcinome épidermoïde
CE/IVD : Directives de l'Union-Européenne/Dispositif médical de diagnostic in vitro
CFB : Centre François Baclesse
CHU : Centre hospitalo-universitaire.
CLv3 : Colon and Lung Cancer Panel v3
CNIL : Commission National de l'Informatique et des Libertés
ctEGFR : Recherche du statut mutationnel de l'EGFR sur ADN tumoral circulant
CQ : Cycle de quantification
EDTA : Éthylènediaminetétraacétique
EGF : Epidermal growth factor
EGFR : Epidermal growth factor receptor
FFPE : Formalin-fixed paraffin-embedded
HER2 : Human epidermal growth factor receptor 2
HES : Hémalun, Eosine, Safran
IASLC : International Association for the Study of Lung Cancer
IHC : Immunohistochimie
ITK : Inhibiteur de tyrosine kinase
KRAS : Kirsten rat sarcoma virus
MGG : May-Grünwald Giesma
NGS : Next-Generation Sequencing
NOS : Not otherwise specified
NTRK : Neurotrophic tyrosine receptor kinase
PA : Unité-paquet-année : unité de mesure de la consommation de tabac fumé en cigarette.
PD-L1 : Programmed death-ligand 1
PD1 : Programmed cell Death protein 1
RCP : Réunion de concertation pluridisciplinaire
SF-MOCAE : Structure fédérative MOCAE
TK : Tyrosine kinase
TPS : Tumor Proportion Score
TTF-1 : Thyroid transcription factor-1
VAF : Variant allele frequency

Liste des figures

Figure 1 : Histologie du poumon.

Figure 2 : Carcinome neuro-endocrine à petites cellules.

Figure 3: Adénocarcinome

Figure 4 : Épithélium bronchique et métaplasie malpighienne de l'épithélium bronchique.

Figure 5 : Carcinome épidermoïde bien différencié

Figure 6 : Carcinome adénoquameux.

Figure 7 : Proposition d'arbre décisionnel pour le diagnostic des carcinomes indifférenciés.

Figure 8 : Présentation schématique du récepteur de l'EGFR avec les différentes voies de signalisation en aval.

Figure 9 : Représentation schématique du gène de l'EGFR et des différentes mutations sensibles et résistantes aux ITK.

Figure 10 : Arbre décisionnel pour le traitement des CBPNPC non épidermoïde à un stade avancé.

Figure 11 : Flow chart.

Figure 12 : Technique de préservation du bloc par ruban.

Figure 13 : Un instrument et la console Idylla™.

Figure 14 : Cartouche Idylla™

Figure 15 : Système PlexPrimer et PlexZyme de la société SpeedX.

Figure 16 : Résultats affichés sur la console Idylla™.

Figure 17 : Interface Idylla™ Explore.

Figure 18 : Critères recommandés pour la sélection des échantillons de l'Idylla™ EGFR Mutation Test.

Figure 19 : Résultats Test 1 échantillon n°1.

Figure 20 : Résultats test 2 échantillon n°1.

Figure 21 : Différentes étapes du temps technicien de la technique Idylla™.

Figure 22 : Flow chart avec détails des résultats Idylla™ et NGS.

Figure 23 : Répartition des CQ de contrôle de l'EGFR de chaque échantillon validé par la technique Idylla™ et le biologiste.

Figure 24 : Courbes d'amplifications détectées, validées et non validées par le système Idylla™ du patient 2.

Figure 25 : Délai d'analyse de EGFRm en jours ouvrés par technique Idylla™ et NGS.

Figure 26 : Délai d'analyse de EGFRm en jours calendaires par technique Idylla™ et NGS.

Figure 27 : Délai en jours ouvrés de la mise sous traitement avec les différents délais d'analyse Idylla™, NGS et RCP pour les 16 patients mutés diagnostiqués par la technique Idylla™ et traités par un ITK.

Figure 28 : Répartition des cellularités tumorales des échantillons avant et après réalisation des copeaux nécessaire à la recherche de EGFRm.

Figure 29 : Délai d'analyse en jours ouvrés des statuts PD-L1, ROS1 et ALK et de EGFRm par technique Idylla™ et NGS.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des traitements dans les CBPNPC muté EGFR.

Tableau 2 : Tableau résumant les techniques pré-analytiques des deux sites.

Tableau 3 : Récapitulatif des 5 tests rétrospectifs pour estimer la quantité minimale de copeaux FFPE au sein de notre laboratoire.

Tableau 4 : Caractéristique de la population des patients de l'étude ID-MUT.

Tableau 5 : Résultats du statut mutationnel de l'EGFR par technique Idylla™ comparés à la méthode de référence (NGS).

Tableau 6 : Concordance et discordance entre les résultats du statut mutationnel de l'EGFR déterminés par technique Idylla™ et méthode de référence (NGS).

Tableau 7 : Concordance du résultat de recherche des mutations de l'EGFR par la technique Idylla™ avec celui de la méthode de référence (NGS).

Tableau 8 : Détails des mutations rares présentes au sein de la cohorte non recherchée par Idylla™ et leurs valeurs prédictives à la réponse aux ITK.

Tableau 9 : Comparaison des délais d'analyses de EGFRm par technique Idylla™ et NGS.

Tableau 10: Comparaison des cellularités tumorales avant et après réalisation des copeaux pour l'analyse de biologie moléculaire.

Tableau 11 : Comparaison des délais d'analyses de PD-L1, ROS et ALK.

Liste des annexes

Annexe 1 : Classification OMS 2015 des ADK bronchopulmonaire organisée suivant le degré d'invasion et l'architecture prédominante de la prolifération cellulaire néoplasique.

Annexe 2 : Nomenclature des mutations détectées par l'Idylla™ EGFR Mutation Test.

Annexe 3 : Fiche technique Idylla™ mutation EGFR.

Annexe 4 : Détails des délais en jours ouvrés de mise sous traitement des 25 patients mutés EGFR.

Annexe 5 : Article de l'étude ID-MUT soumis dans le journal Current Oncology.

Sommaire

I- Introduction	1
A- Avant-Propos	1
B- Épidémiologie et histo-pathologie	3
C- Prise en charge diagnostique du carcinome pulmonaire	8
D- Le gène de l'EGFR et les inhibiteurs de tyrosine kinase	11
E- Traitement des patients atteints d'un CBPNPC à un stade avancé	14
II- Matériels et méthodes	16
A- Mise en place de l'étude ID-MUT : comparaison de méthode de rendu de résultats du statut mutationnel de l'EGFR par NGS et technique Idylla™ au sein des services d'Anatomie et Cytologie Pathologique (ACP) et de pneumologie et oncologie thoracique du CHU de Caen	16
B- Patients	16
C- Prescription de la recherche des mutations de l'EGFR	17
D- Nature des prélèvements tumoraux analysés	18
E- Technique IDYLLA™ mutation - EGFR	23
F- Technique NGS	34
G- Estimation du coût	35
H- Analyses statistiques	35
III- Résultats	37
A- Caractéristiques de la population des patients de l'étude ID-MUT	37
B- Concordance entre les résultats du statut mutationnel de l'EGFR déterminés par technique de l'Idylla et la méthode de référence (NGS)	40
C- Délai d'analyse Idylla™ versus NGS	45
D- Bénéfice pour le patient	47
E- Consommation des prélèvements tumoraux inclus en paraffine pour le duo d'analyses du statut mutationnel de l'EGFR par Idylla™ et NGS	48
F- Délai d'analyse de l'expression de PD-L1 et de la recherche de fusion ALK et ROS1	49
IV- Discussion	52
V- Conclusion	58
Perspectives	59
Bibliographie	60
Annexes	63

I- Introduction

A- Avant-Propos

Le cancer bronchique est la première cause de décès par cancer dans le monde (1). Les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBPNPC) représentent 85% des cas de cancers bronchiques et l'adénocarcinome est le sous-type le plus fréquent (2). Environ 80% des patients atteints de CBPNPC présentent ou rechutent à un stade avancé de la maladie (stade III-IV) et ne sont pas éligibles au traitement chirurgical et relèvent d'un traitement systémique (2,3). Ces traitements systémiques ont été révolutionnés par l'analyse moléculaire des CBPNPC favorisant le développement des thérapies ciblées et de l'immunothérapie. Parmi les anomalies moléculaires de ces cancers appelées "driver" figurent : des mutations des gènes *KRAS* (30 %), du récepteur à l'EGF (12 %), de *ERBB2* (2 %), de *BRAF* (2%), l'amplification du récepteur *c-MET* (3 %) et les remaniements des gènes *ALK* (5 %), *ROS1* (2%), *NTRK* (<1%) ou *RET* (2%) (4). Actuellement, seules les mutations *EGFR* et les remaniements des gènes *ALK* ou *ROS1* permettent aux patients atteints d'un CBPNPC non épidermoïde d'être éligibles à une thérapie ciblée en première ligne. En l'absence de ces mutations le traitement de première ligne consiste selon l'expression de PD-L1, soit à une immunothérapie soit à une chimiothérapie à base de sels de platine (5,6) Les tests moléculaires recommandés aux institutions prodiguant des soins aux patients atteints d'un cancer du poumon sont (i) un panel complet incluant tous les gènes (*EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *MET*, *ERBB2* [HER2], *KRAS*, *RET*) pour tous les patients appropriés ou (ii) des tests ciblés pour les gènes de la catégorie nommés "tests obligatoires" (*EGFR*, *ALK*, *ROS1*) et dans un second temps un panel élargi (*BRAF*, *MET*, *ERBB2* [HER2] et *RET*) pour les patients candidats à des essais cliniques, éventuellement après avoir exclu une mutation *KRAS* par une technique ciblée (7). La mutation *KRAS* confère une résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) ciblant l'EGFR et, dans plus de 99% des cas, est exclusive d'une altération génétique driver (8,9).

En janvier 2018, le collège américain des pathologistes (CAP), l'association internationale pour l'étude du cancer pulmonaire (IASLC), l'association de pathologie moléculaire (AMP) et la société américaine d'oncologie clinique (ASCO)

recommandent un délai d'attente de 10 jours ouvrables entre la réception de l'échantillon et la communication des résultats des tests moléculaires.

A Caen, la recherche des réarrangements *ALK*, *ROS1* et l'expression de PD-L1 se fait par technique d'immunohistochimie et la positivité est confirmée par FISH pour *ALK*. Le délai moyen en 2018 était en moyenne de 49,5 jours calendaires (valeur minimale = 8 jours ; valeur maximale = 147 jours) (10). Ce délai ne serait pas lié au délai technique mais à l'organisation du service et des pathologistes. Le délai moyen entre la demande de recherche des mutations de l'*EGFR* et le rendu de l'analyse était de 42,5 jours calendaires en 2018 (10). Ce délai est lié au fait que les techniques conventionnelles de biologie moléculaire ont progressivement laissé place à des techniques de séquençage haut débit (NGS). Or, ces analyses haut débit présentent l'avantage d'être globales, mais aussi l'inconvénient d'augmenter les temps de réponse entre la demande de recherche de mutation et le rendu de l'analyse moléculaire et donc à retarder la prise en charge thérapeutique des patients.

Afin de raccourcir le délai de réponse concernant le statut mutationnel *EGFR*, l'équipe de pathologie moléculaire s'est intéressée à la technique Idylla™. Depuis 2017, la société Biocartis commercialise un kit de détection des mutations de l'*EGFR* aux normes CE/IVD fonctionnant sur l'automate Idylla™, couplant l'extraction d'ADN à la recherche de mutation sur un échantillon fixé au formol et inclus en paraffine (FFPE). Cet automate réalise cette analyse en 129 minutes une fois les copeaux du bloc de paraffine effectués.

L'objectif de cette étude était de mettre i) en place la recherche de mutations du gène de l'*EGFR* par l'automate Idylla™, ii) d'évaluer sur une cohorte de 225 patients la concordance des résultats entre la technique de référence du CHU de Caen (analyse d'un panel de gènes par séquençage haut débit) et la technique Idylla™ et iii) d'évaluer le délai de réponses du diagnostic des mutations du gène de l'*EGFR* entre les techniques Idylla™ et le NGS. Cette étude a aussi permis d'évaluer le délai d'analyse des statuts *ALK*, *ROS1* et *PD-L1* sur une plus grande cohorte.

B- Épidémiologie et histo-pathologie

Le carcinome broncho-pulmonaire est le cancer le plus fréquent à travers le monde. Il représente un enjeu majeur de santé publique à l'échelle mondiale avec environ 2 millions de nouveaux cas diagnostiqués par an et environ 1,7 millions de décès par an (1). En France, il s'agit en matière d'incidence du deuxième cancer de l'homme et du troisième cancer de la femme, avec une survie faible, de l'ordre de 16% à 5 ans. Alors que chez l'homme le taux d'incidence stagne et le taux de mortalité chute, ces indicateurs augmentent chez la femme en raison d'une consommation tabagique en augmentation (11).

Si l'on s'intéresse aux différents types histologiques et à leur poids respectif, on constate chez l'homme que l'incidence des carcinomes épidermoïdes et les carcinomes neuroendocrines à petites cellules diminue alors que celle des adénocarcinomes augmente (11). Une des principales hypothèses qui pourraient expliquer ces variations d'incidence, et en particulier l'augmentation des adénocarcinomes, est le changement de structure (ajout d'un filtre) et de composition (produit plus riche en nitrosamines) des cigarettes industrielles : l'ajout de filtres aux cigarettes industrielles entraînerait une inhalation plus profonde des fumeurs afin de recevoir une dose satisfaisante de nicotine, provoquant alors une diffusion plus périphérique dans le poumon des particules carcinogènes comme les nitrosamines (12,13).

L'Organisation Mondiale de la Santé distingue schématiquement deux grandes catégories de carcinomes pulmonaires (2) : les carcinomes dit « à petites cellules », minoritaires (environ 15% des cas), développées à partir des cellules neuroendocrines pulmonaires, et les carcinomes « non à petites cellules », majoritaires (environ 85% des cas) et développés à partir des cellules épithéliales (Figure 1). Ces derniers se subdivisent en deux grandes catégories : les carcinomes épidermoïdes (20% des cas environ) et les carcinomes « non à petites cellules non épidermoïdes », largement représentés par les adénocarcinomes (40% des cas environ).

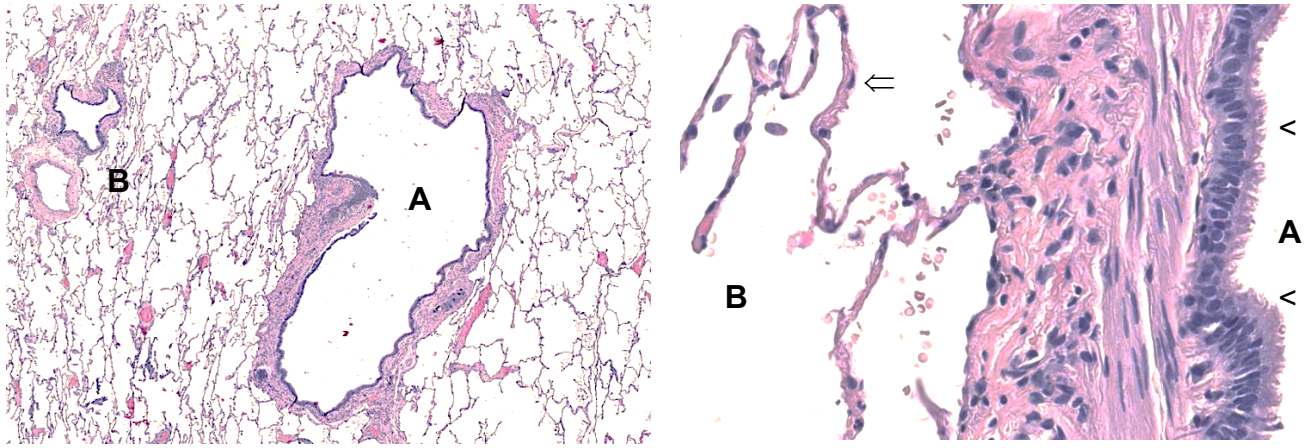


Figure 1 : Histologie du poumon.

A : L'arbre bronchique – épithélium respiratoire pseudostratifié constitué de cellules épithéliales (ciliées ou mucosécrétantes – flèches >) et de quelques cellules épithéliales neuro-endocrines.

B : Parenchyme périphérique : bronchiole terminale, bronchiole respiratoire, alvéole. Les alvéoles sont tapissées de pneumocytes (flèche ⇒)(type I : barrière air-sang et type II production de surfactant).

Le **carcinome « à petites cellules »** correspond à une tumeur de nature neuro-endocrine dont le principal facteur de risque est le tabagisme. La présentation clinique est souvent celle d'une lésion proximale très agressive, envahissant souvent le médiastin au diagnostic. La morphologie microscopique est d'ordinaire très caractéristique : les cellules tumorales sont basophiles, de petite taille, au nucléole absent et au cytoplasme très peu abondant (Figure 2). Elles se disposent souvent en plages compactes et il est fréquemment noté, surtout sur prélèvements biopsiques, des artefacts d'écrasements. Le TTF1 (Thyroid transcription factor 1) et les marqueurs neuroendocrines (chromogranine, synapthophysine et CD56) sont fréquemment exprimés. L'index de prolifération cellulaire estimé par l'immunomarquage Ki67 est très élevé, souvent supérieur à 80%. Actuellement, aucun examen théranostique de routine n'est recommandé dans le cadre de cette pathologie.

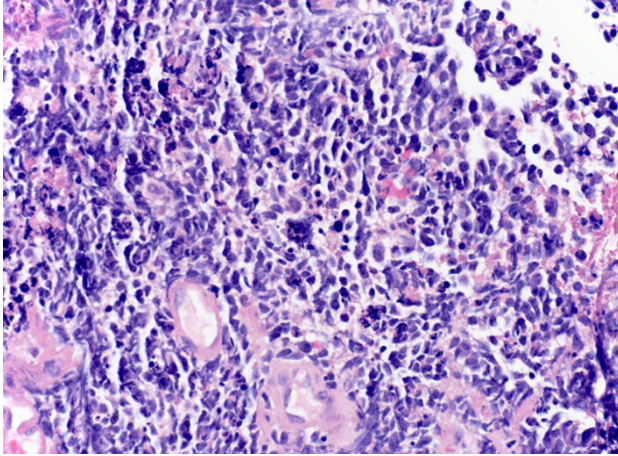


Figure 2 : Carcinome neuro-endocrine à petites cellules.

Prolifération tumorale diffuse de cellules basophiles au cytoplasme peu abondant.

Carcinome non à petites cellules :

L'**adénocarcinome** (ADK) est supposé issu des pneumocytes de type 2, les cellules produisant le surfactant alvéolaire (14). La présentation clinique est souvent celle d'une lésion distale, intra-parenchymateuse. Il touche principalement les patients fumeurs. Il correspond à une tumeur maligne épithéliale présentant une différenciation glandulaire (Figure 3) et/ou une production de mucus et/ou une expression immunohistochimique de marqueurs pneumocytaires (TTF-1). Il existe, selon la classification OMS 2015, de nombreux sous-types d'adénocarcinomes pulmonaires suivant le caractère invasif et l'architecture prédominante de la prolifération néoplasique (Annexe 1).

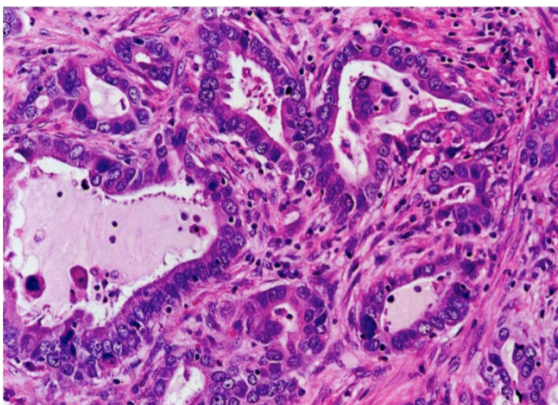


Figure 3: Adénocarcinome

Visualisation de la différenciation glandulaire.

Le **carcinome épidermoïde** (CE) est de nature malpighienne et sa survenue dans le poumon, normalement dépourvu d'épithélium malpighien, s'explique par les phénomènes de métaplasie malpighienne de l'épithélium bronchique, conséquence souvent directe du tabagisme chronique (Figure 4). De ce fait, il s'agit d'une tumeur le plus souvent proximale survenant à partir des bronches. Toutefois, dans un tiers des cas, il se développe en périphérie au contact des zones d'emphysèmes. Il se définit comme étant une tumeur maligne épithéliale pouvant être soit bien différenciée avec mise en évidence de kératine et/ou jonctions inter-cellulaires (Figure 5), soit peu différenciée mais avec une expression de marqueurs immunohistochimiques prouvant la différenciation malpighienne (P40 et P63) et une absence d'expression de TTF-1. Il existe, selon la classification OMS 2015, des variantes de carcinome épidermoïde selon le degré de différenciation malpighienne et l'architecture de la prolifération (kératinisant, non kératinisant et basaloïde).

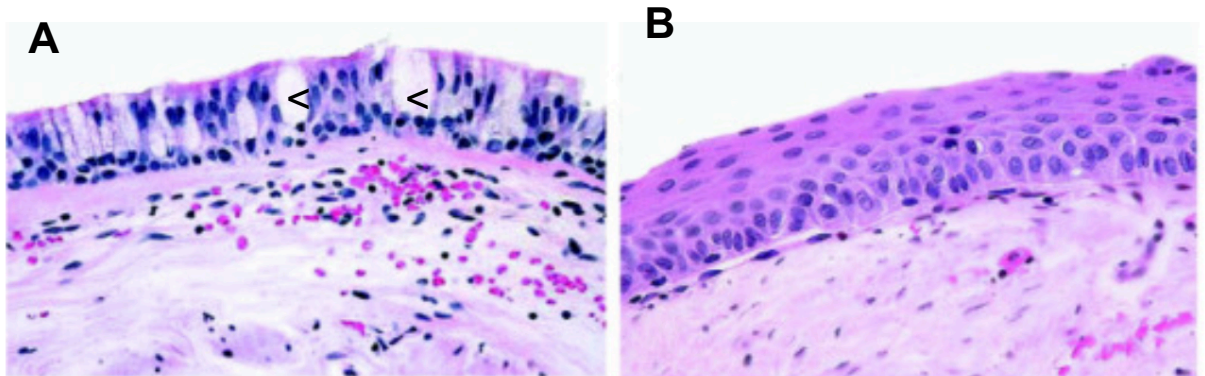


Figure 4 : Épithélium bronchique et métaplasie malpighienne de l'épithélium bronchique.

A : Épithélium respiratoire pseudostratifié cilié à cellules à mucus (flèche <)
 B : Épithélium malpighien stratifié non kératinisant

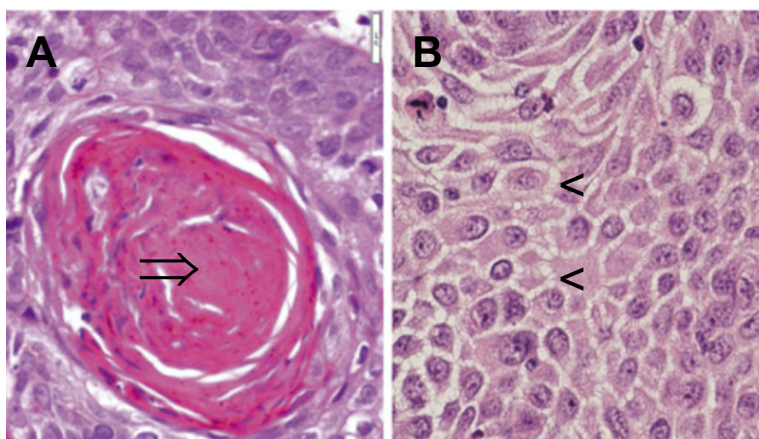


Figure 5 : Carcinome épidermoïde bien différencié

A : Kératine (flèche =>) B : Jonctions inter-cellulaires (flèches <).

Le **carcinome adénosquameux** (Figure 6) représente environ 0,4 à 4% des CBPNPC et touche principalement les hommes fumeurs. Il se définit comme étant une tumeur épithéliale maligne associant un contingent épidermoïde et un contingent adénocarcinomateux, chacun d'entre eux représentant au moins 10% de la surface tumorale. Le diagnostic ne peut être établi de façon certaine que sur pièce opératoire et dans des cas privilégiés, suggérés sur des biopsies.

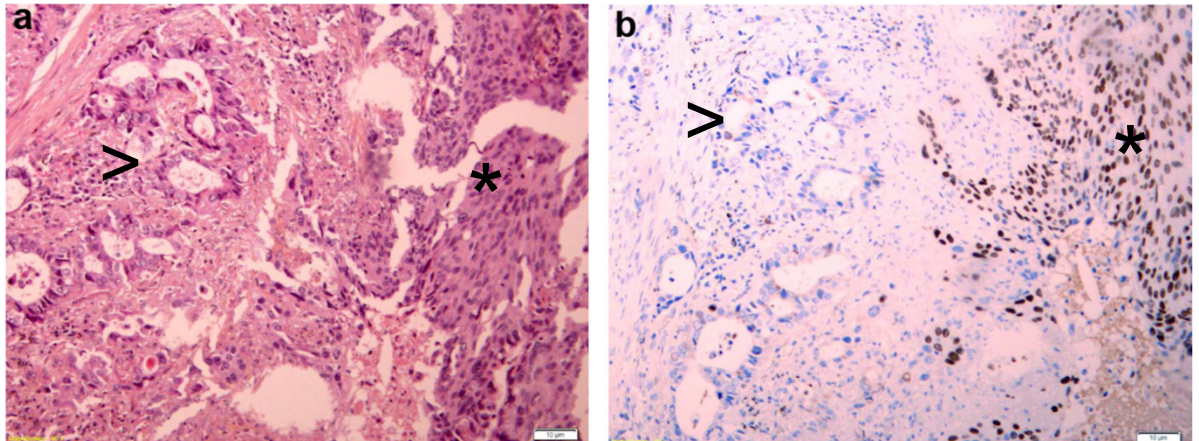


Figure 6 : Carcinome adénosquameux.

A : Coloration HES - Juxtaposition de deux composantes, épidermoïde bien différenciée (*) et adénocarcinomateuse (<), acinaire.

B : Immunohistochimie p40 - Juxtaposition de deux composantes, épidermoïde bien différenciée (*), p40 positive et adénocarcinomateuse (<), acinaire p40 négative.

Le **carcinome à grandes cellules** représente environ 2% des CBPNPC et touche principalement les hommes fumeurs autour de 60 ans. Il s'agit de tumeur de grande taille, de siège périphérique et de contenu solide ou nécrosé. Il présente une définition très restrictive et peut-être diagnostiqué seulement sur pièce opératoire. Il s'agit d'un CBPNPC n'ayant aucun critère de différenciation architecturale ou immunohistochimique en faveur d'un adénocarcinome, d'un carcinome épidermoïde ou d'un carcinome neuroendocrine après l'examen de la totalité de la tumeur afin de s'assurer de l'absence de territoire tumoral plus différencié qui permettrait de reclasser la prolifération tumorale. Le diagnostic anatomopathologique des carcinomes à grandes cellules repose sur une prolifération cellulaire néoplasique de cellules cohésives, organisées en plages, avec des critères de malignité évidents en l'absence de différenciation particulière. Les cellules néoplasiques sont volontiers polygonales, aux noyaux vésiculeux, des nucléoles proéminents et peuvent contenir des inclusions

cytoplasmiques éosinophiles. Néanmoins, le carcinome à grandes cellules est un diagnostic d'exclusion basé sur l'absence de différenciation morphologique, histochimique et immunohistochimique dont il faudra s'attacher à éliminer toute autre variété de carcinome.

C- Prise en charge diagnostique du carcinome pulmonaire

Circonstance de découverte

Le diagnostic de carcinome pulmonaire nécessite une preuve histopathologique, parfois difficile à obtenir. Il est à noter que plus de 75% des cancers pulmonaires sont découverts à un stade localement avancé ou métastatique car la tumeur ne devient souvent symptomatique que tardivement, lorsqu'elle métastase (souvent au système nerveux central, au foie, aux os ou à la peau). Les symptômes respiratoires sont aspécifiques, à type de toux, d'hémoptysie ou de dyspnée. Il existe également des syndromes paranéoplasiques fréquemment associés à cette maladie, comme l'hippocratisme digital, l'hyponatrémie, un syndrome fébrile prolongé, ou encore une ostéoarthropathie hypertrophiante pneumique de Pierre-Marie, sans oublier une pseudomyasthénie ou une neuropathie périphérique. Dans bien des cas cependant, la découverte de la lésion est fortuite, sur une radiographie ou un scanner thoracique réalisé pour toute autre raison (15).

Obtention d'une preuve histologique de cancer

Le diagnostic histopathologique d'une lésion pulmonaire peut-être obtenu par différents moyens : la biopsie conventionnelle par voie endo-bronchique, la biopsie endo-bronchique distale par voie échoendoscopie bronchique, la biopsie trans-thoracique guidée par scanner, la chirurgie et les prélèvements cytopathologiques (épanchement pleural et ganglion lymphatique essentiellement). La fibroscopie bronchique conventionnelle permet la visualisation de l'arbre respiratoire jusqu'au niveau des bronches sous-segmentaires et la réalisation éventuelle de prélèvements biopsiques de la tumeur si celle-ci est visualisée. Il est possible de coupler cette procédure avec une exploration échographique (écho-endoscopie) des structures contiguës à l'arbre respiratoire, comme des adénopathies satellites, qui pourront alors être ponctionnées. La ponction-biopsie transpariétale nécessite quant à elle un guidage scanographique et trouve d'ordinaire tout son intérêt pour les lésions pulmonaires périphériques inaccessibles par voie endoscopiques. Enfin, la chirurgie

est le recours souvent envisagé après échec des procédures diagnostiques moins invasives, surtout si la probabilité de malignité est forte.

Le diagnostic des CBPNPC doit privilégier les prélèvements histologiques (4,5). Les prélèvements cytologiques inclus en paraffine (cytobloc) permettent également la réalisation d'études immunohistochimiques et moléculaires. Depuis 2016, l'European Expert Group recommande au moins 5 biopsies pour le diagnostic et 5 biopsies supplémentaires pour phénotype et génotypage (3). En cas de biopsies trans-thoraciques sous scanner pour des lésions périphériques, il est nécessaire de réaliser 1 à 2 carottes, en gauge 18.

Technique

La fixation des prélèvements histologiques doit utiliser le formol (temps de fixation entre 6h et 48h) et éviter les sur-fixations ou les sous-fixations afin de préserver au maximum la morphologie tissulaire et les acides nucléiques.

Au moment de la réalisation des lames d'histologie, pour maximiser la disponibilité des tissus, deux stratégies peuvent être utilisées :

- 1 La première consiste à effectuer une section minimalement invasive pour un premier examen et un diagnostic préliminaire.
- 2 L'autre stratégie consiste à effectuer des rubans (couper plusieurs sections du prélèvement inclus en paraffine) et à les conserver jusqu'à ce qu'un diagnostic préliminaire ait été posé et qu'un test complémentaire soit demandé.

La découpe ne doit être effectuée que par les techniciens les plus expérimentés et la fréquence de recoupe des blocs doit être minimisée. Idéalement les sections pour tous les tests complémentaires devraient être coupées au cours de la même session.

Diagnostic sur biopsie

Sur les petits prélèvements, la morphologie évocatrice de différenciation malpighienne ou glandulaire n'est pas toujours présente sur la coloration classique Hémalum-Eosine-Safran (HES). Ainsi il est recommandé de réaliser une recherche des mucines par des colorations spéciales afin de mettre en évidence le caractère glandulaire de la tumeur et/ou une étude en immunohistochimie (IHC) avec les anticorps anti-TTF1 et P40. Le facteur de transcription thyroïdien-1 (TTF-1) est

surexprimé dans 95% des adénocarcinomes pulmonaires primitifs alors qu'il est négatif pour presque tous les carcinomes épidermoïdes (16). Le P40 est un anticorps qui reconnaît l'isoforme $\Delta Np63$ -a du p63 suggéré comme hautement spécifique des cellules squameuses et basales et qui est positif dans 100% des carcinomes épidermoïdes (17). La cytokératine 7 a été utilisée comme marqueur d'adénocarcinome pulmonaire mais sa place est actuellement controversée et ne doit plus être systématique (2). Les marqueurs neuroendocrines ne doivent être demandés que s'il y a une morphologie neuroendocrine.

Afin de gagner du temps et de maximiser le matériel, il est recommandé au sein du laboratoire de prédéfinir des panels de tests, des algorithmes et des tests réflexes (Figure 7).

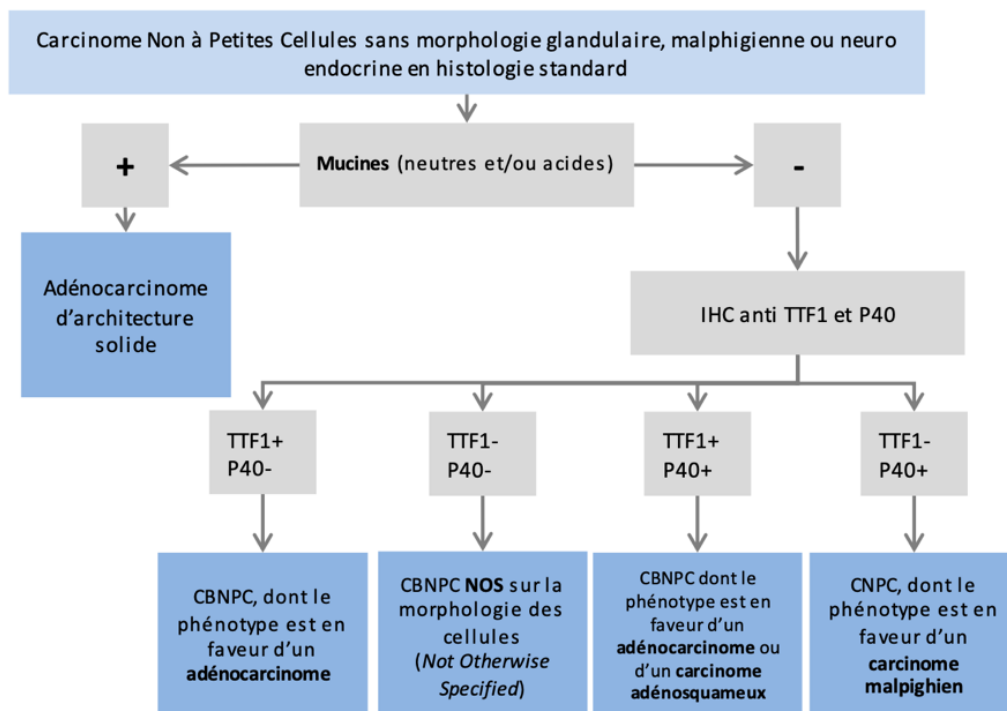


Figure 7 : Proposition d'arbre décisionnel pour le diagnostic des carcinomes indifférenciés.

Arbre décisionnel de Couraud et al 2021 (5)

Mucines : mises en évidence de mucines par les colorations spéciales, PAS (Periodic Acid Schiff) (mucines neutres) et Bleu Alcian (mucines acides).

IHC : immunohistochimie

TTF1 : Facteur de transcription thyroïdien-1 surexprimé dans 95% des adénocarcinomes.

P40 : Anticorps spécifique des cellules squameuses et basales, positif dans 100% des carcinomes épidermoïdes.

CBNPC : carcinome bronchique non à petites cellules.

Marqueurs théranostiques :

La recherche des anomalies moléculaires suivantes est recommandée dans tous les CBPNPC non épidermoïdes et dans les carcinomes épidermoïdes des non-fumeurs (ou petits fumeurs (moins de 5 paquets-années), ou sevrés depuis plus de 20 ans) de stades avancés. Le recours à l'ADN circulant et/ou la re-biopsie doit être large en cas de matériel insuffisant lors de la biopsie initiale.

- Dès le diagnostic initial : expression de PD-L1, mutations de l'*EGFR*, translocations des gènes *ALK* et *ROS1*.
- Systématiquement avant la seconde ligne : mutation V600E de *BRAF*, saut de d'exon 14 de *MET*, mutation G12C de *KRAS*, fusions de gènes *RET* et de *NTRK1-3*.
- De manière facultative (inclusion dans des protocoles de recherche) : amplifications de *MET*, les mutations de ERBB2 (HER2) et autres réarrangements géniques.

Chez les non-fumeurs, les statuts *EGFR*, *ALK*, *ROS1* et l'expression de PD-L1 doivent impérativement être connus avant de débiter le traitement de 1^{ère} ligne.

D- Le gène de l'EGFR et les inhibiteurs de tyrosine kinase

Le gène de l'*EGFR* est localisé sur le bras court du chromosome 7 (7p11.2) et code pour un récepteur transmembranaire à des facteurs de croissance appartenant à la famille des récepteurs à tyrosine kinases HER/erbB, incluant HER1 (*EGFR/erbB1*), HER2 (*erbB2*), HER3 (*erbB3*) et HER4 (*erbB4*).

Les tyrosine kinases sont des enzymes qui jouent un rôle majeur dans la signalisation cellulaire en aval des facteurs de croissance. Elles assurent le transfert d'un groupement phosphate de l'adénosine triphosphate (ATP) vers une protéine effectrice impliquée dans de nombreux processus de régulation cellulaire.

Leur structure moléculaire est similaire : ils ont un domaine extracellulaire riche en cystéine, liant le ligand ; un domaine transmembranaire ; un domaine cytoplasmique à activité tyrosine kinase (TK) (dans tous les récepteurs sauf HER3) ; et un domaine de signalisation carboxy-terminal. La liaison des ligands conduit à l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation (avec un autre récepteur de la famille) et à la transphosphorylation des résidus tyrosine de la queue carboxy, activant les voies de signalisation RAS-RAF-

MEK-MAPK, la voie PI3K-PTEN-AKT et l'activateur de la transcription STAT. La signalisation en aval de l'EGFR entraîne une augmentation de la prolifération, de l'angiogenèse, de l'invasion et une diminution de l'apoptose (8) (Figure 8).

L'activité TK de l'EGFR peut être dérégulée par plusieurs mécanismes oncogéniques, notamment la mutation du gène de l'EGFR, l'augmentation du nombre de copies du gène et/ou la surexpression de la protéine EGFR (18). Dix à quinze pour cent des adénocarcinomes pulmonaires dans la population caucasienne (et plus de 70% dans la population asiatique) présentent une mutation du gène de l'EGFR située dans le domaine TK conduisant à une activation constante de l'EGFR indépendamment de la présence de son ligand (Figure 9). Le profil type des patients est : femme, peu ou non exposé au tabac, d'origine asiatique avec un adénocarcinome de forme lépidique (9).

Les mutations activatrices sont situées sur les exons 18, 19, 20 et 21 du gène de l'EGFR, soit dans l'exon encodant la poche de liaison à l'ATP et ses contours. Les plus fréquentes sont la délétion de l'exon 19 (45%) et la mutation faux-sens L858R (40%) de l'exon 2 (19). Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) se fixent de manière compétitive sur les sites de liaisons de l'ATP et bloquent ainsi l'activation des sites tyrosine kinase. Les ITK de l'EGFR de première génération, y compris le gefitinib et l'erlotinib, ont montré en première ligne chez les patients mutés EGFR un meilleur taux de réponse au traitement et une meilleure survie sans progression comparée aux patients non mutés EGFR (8). Les ITK de l'EGFR de première génération sont des inhibiteurs d'ATP compétitifs réversibles qui ciblent uniquement l'EGFR, tandis que les ITK de deuxième génération incluant l'afatinib et le dacomitinib sont des inhibiteurs irréversibles qui ciblent également HER2 et HER4.

Malgré l'efficacité des TKI de l'EGFR, inéluctablement, les patients atteints de CBPNPC avec mutation de l'EGFR développeront une résistance à ce traitement. La cause la plus courante de résistance acquise aux ITK de première génération est l'apparition d'une seconde mutation dans l'exon 20 de l'EGFR, la T790M. Cette mutation affecte l'efficacité initiale de l'ITK soit par encombrement stérique, soit par augmentation de l'affinité du domaine tyrosine kinase pour l'ATP. Les autres causes de résistances aux ITK de l'EGFR sont l'amplification de *ERBB2*, les mutations *MET*, *BRAF*, *PIK3CA* ou la transformation du CPNPC initial en cancer à petites cellules.

L'ITK de l'EGFR de troisième génération est un inhibiteur actif sur les mutations T790M, en épargnant l'EGFR sauvage. Ce médicament se lie de manière covalente à la cystéine sur le codon 797, surmontant ainsi l'affinité améliorée à l'ATP de la mutation T790M (8). L'osimertinib, ITK de 3^{ème} génération est devenu le traitement de référence des CBPNPC métastatiques EGFR muté, en 1^{ère} ligne, ou en 2^{ème} ligne et plus en cas de mise en évidence d'une mutation T790M (20). Malheureusement, malgré une bonne réponse initiale, les patients traités avec l'ITK de 3^{ème} génération développent une résistance acquise et la plus courante est liée à la mutation C797S de l'EGFR. Quand cette mutation est localisée sur le même allèle que la mutation T790M (c'est-à-dire en CIS), la tumeur devient résistante à tous les ITK de l'EGFR (21).

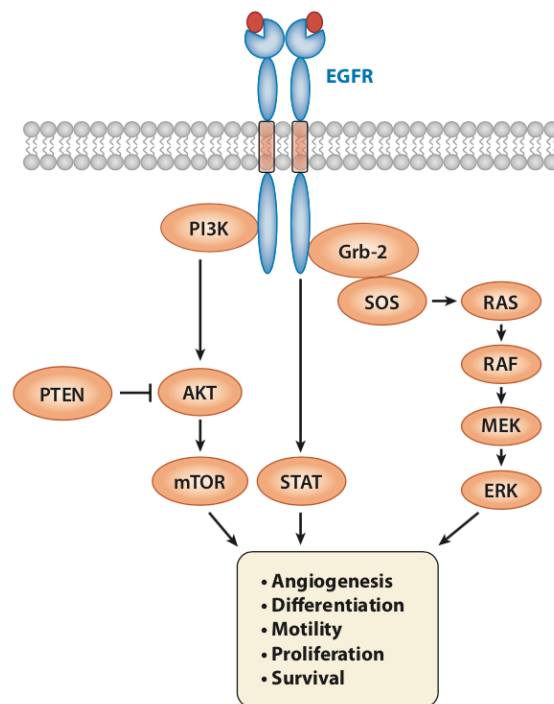


Figure 8 : Présentation schématique du récepteur de l'EGFR avec les différentes voies de signalisation en aval.

Schéma d'après Da Cunha Santos et al. 2011 (18).

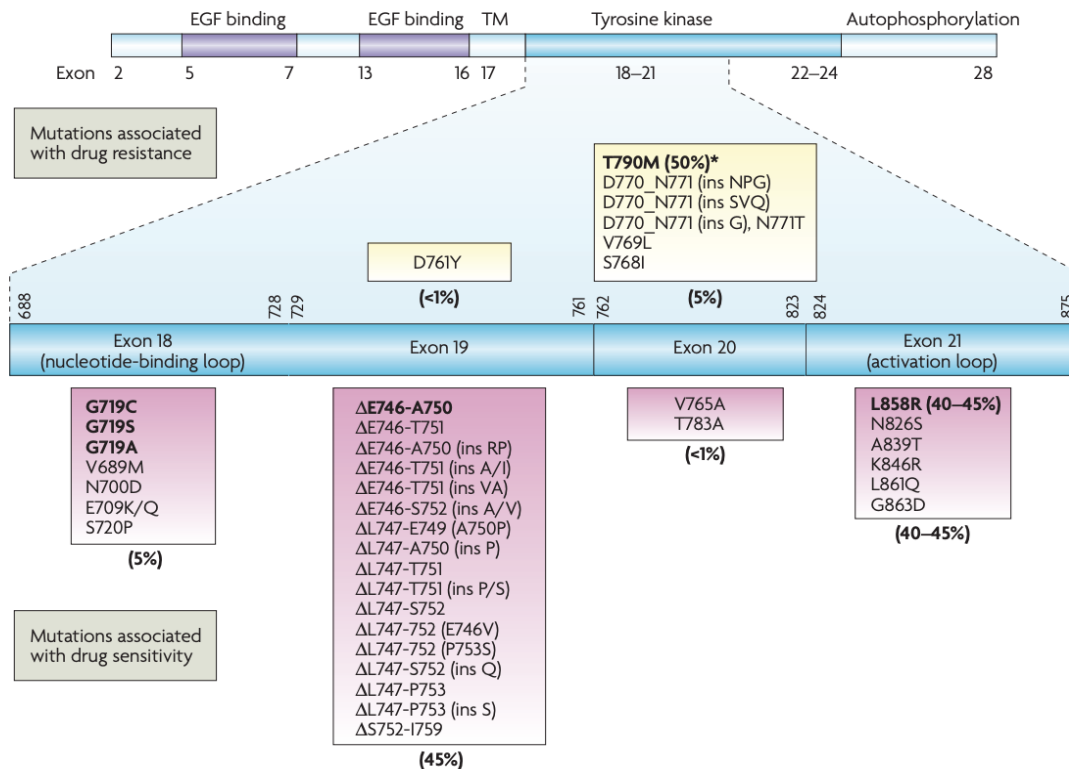


Figure 9 : Représentation schématique du gène de l'EGFR et des différentes mutations sensibles et résistantes aux ITK.

Schéma d'après Sharma et al 2007 (19)

E- Traitement des patients atteints d'un CBPNPC à un stade avancé

Ces patients relèvent exclusivement d'un traitement systémique dont le choix de la thérapeutique de première ligne dépendra de la présence ou de l'absence d'une altération moléculaire ciblable (mutation *EGFR*, fusion *ALK* et *ROS1*) dans les cas de CBPNPC non épidermoïdes et carcinomes épidermoïdes des non-fumeurs.

Les patients présentant une altération moléculaire pourront recevoir en première ligne de traitement une thérapie ciblée par voie orale d'inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) de l'EGFR (gefitinib, erlotinib, afatinib et osimertinib, Tableau 1) ou d'ALK/ROS1(crizotinib).

En cas de progression sous ITK, il conviendra de rechercher le mécanisme de résistance sur ADN tumoral circulant ou sur biopsie tissulaire.

La stratégie thérapeutique sera orientée soit vers la réalisation d'une chimiothérapie, soit vers un ITK de nouvelle génération en fonction de l'analyse moléculaire.

Les patients sans altération moléculaire ciblable seront traités par chimiothérapie parfois d'emblée associée à une immunothérapie anti-PD-1 (Pembrolizumab) suivant le statut tumoral de PD-L1 en IHC (Figure 10) (5).

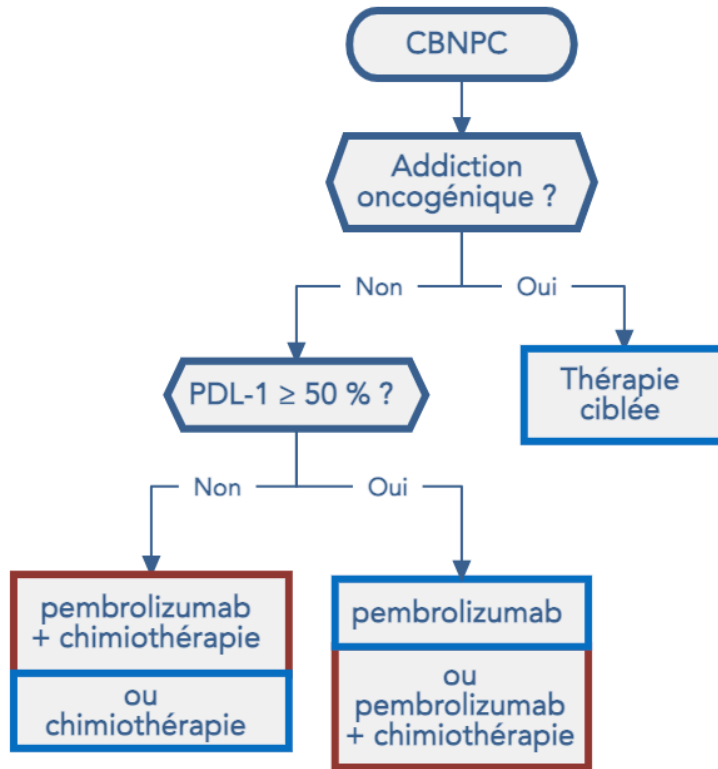


Figure 10 : Arbre décisionnel pour le traitement des CBNPC non épidermoïde à un stade avancé.

Arbre décisionnel du site Oncologik (22)

Traitement	Insertions exon 20 de l'EGFR	Mutation activatrice de l'EGFR
1^{ère} ligne	. essai clinique . chimiothérapie	. afatinib . erlotinib . géfitinib . osimertinib (en cas de délétion de l'exon 19, de mutation L858R ou de mutation T790M)

Tableau 1 : Récapitulatif des traitements dans les CBNPC muté EGFR.

Tableau inspiré du site Oncologik (22)

II- Matériels et méthodes

A- Mise en place de l'étude ID-MUT : comparaison de méthode de rendu de résultats du statut mutationnel de l'EGFR par NGS et technique Idylla™ au sein des services d'Anatomie et Cytologie Pathologique (ACP) et de pneumologie et oncologie thoracique du CHU de Caen

Au CHU de Caen, la mise en place et le financement de la comparaison de méthode de rendu de résultats du statut mutationnel de l'EGFR par NGS et technique Idylla™ s'inscrivent dans le cadre de l'étude ID-MUT (Investigateur principal : G Levallet, investigateurs associés : F Bibeau et E Bergot), étude financée par le laboratoire AstraZeneca et la cellule de promotion de l'innovation du CHU de Caen. L'étude a commencé en janvier 2019. L'objectif principal était d'évaluer la concordance des résultats entre les deux techniques, l'objectif secondaire est de comparer le délai de réponse du diagnostic de mutations du gène de l'EGFR entre les deux techniques.

Notre étude était initialement à destination des patients suivis au CHU de Caen. A la demande des cliniciens, elle a été secondairement élargie aux patients suivis au centre de lutte contre le cancer - François Baclesse situé à Caen. Nous avons mis en place un circuit, par lequel nous recevons une demande du pathologiste du centre François Baclesse, avec le diagnostic anatomo-pathologique, le pourcentage de cellules tumorales et les copeaux réalisés par leur soin.

B- Patients

Cette étude a enrôlé des patients atteints de CBPNPC suivis au CHU de Caen et au Centre François Baclesse de manière prospective du 1^{er} janvier 2019 au 31 août 2020.

Les critères d'inclusion étaient les suivants : patient âgé de plus de 18 ans, primo-diagnostiqué d'un cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules (CBPNPC) non épidermoïde ou épidermoïde à la demande du clinicien, affilié à un régime de sécurité sociale, suivi au CHU de Caen ou au Centre François Baclesse.

Les critères de non inclusions étaient : prélèvement tumoral insuffisant pour assurer une étude concomitante NGS et Idylla™ et/ou contenant moins de 10% de cellules tumorales.

Au total 201 patients ont été inclus (Figure 11), 63 patients suivis au CHU de Caen et 138 suivis au Centre François Baclesse.

Les informations cliniques et les délais ont été recueillis à partir du dossier médical de chaque patient par deux internes, Constante PETITEAU, interne spécialisée en pneumologie et moi-même, interne spécialisée en anatomie et cytologie-pathologique.

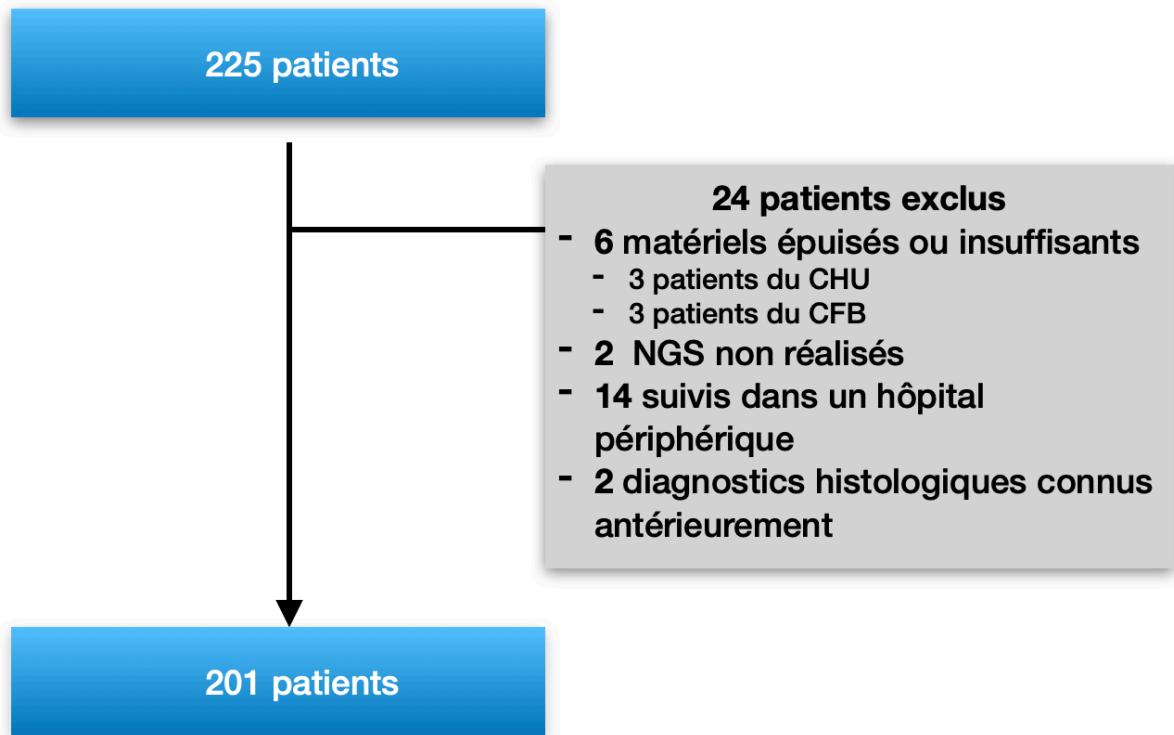


Figure 11 : Flow chart.

Ce projet de recherche a été soumis à la Commission National de l'Informatique et des Libertés (CNIL) (dossier de déclaration : 2204611 v 0) et validé par le comité éthique local. Enfin, cette collection a fait l'objet d'une déclaration auprès du ministère de la Recherche (délibération du 10 avril 2010 du Comité de Protection des Personnes Nord-Ouest III : DC-2008-588).

C- Prescription de la recherche des mutations de l'EGFR

Au diagnostic d'un CBPNPC non épidermoïde sur biopsie ou cytologie, les pathologistes du CHU de Caen et du Centre François-Baclesse (CFB) prescrivent systématiquement l'immunohistochimie *ROS1*, *ALK* et PD-L1 et la recherche de mutation du gène de l'*EGFR* par NGS. La recherche de mutation du gène de l'*EGFR* par technique Idylla™ est prescrite par le pathologiste si le pourcentage de cellules tumorales est supérieur à 10%.

La recherche de mutation « driver » est prescrite par le clinicien pour certains CBPNPC épidermoïde selon des critères cliniques, notamment chez les non-fumeurs (ou petits fumeurs (<5 PA), ou sevrés depuis plus de 20 ans).

D- Nature des prélèvements tumoraux analysés

Le diagnostic pathologique et l'analyse moléculaire des CBPNPC non opérables sont réalisés à partir de la lésion primitive ou d'une localisation secondaire. Les prélèvements sont de petite taille, de type biopsique ou cytoponction. Les techniciennes de chaque laboratoire (CHU, CFB) réalisent les lames pour l'immunohistochimie et des copeaux pour la technique NGS et la technique Idylla™ en préservant le bloc au maximum.

Pré-analytique du service d'Anatomie et Cytologie Pathologie du CHU de Caen (Tableau 2).

Les prélèvements parviennent au laboratoire dans le formol tamponné à 4%.

Les prélèvements de type "biopsie bronchique" sont déposés manuellement dans une cassette et les prélèvements de type "cytoponction ganglionnaire" sont aspirés à l'aide d'une pipette pasteur puis filtrés directement dans une cassette "filtre" avec maillage en nylon. Ensuite les prélèvements sont inclus en paraffine.

Les prélèvements de type liquide pleural arrivent à l'état frais au laboratoire. Ils sont centrifugés, puis à partir du culot une lame colorée au MGG (May-Grünwald Giemsa) est réalisée par étalement. Le culot cellulaire restant est fixé en formol tamponné à 4% et est ensuite déposé en gélose 3% avant d'être mis en cassette "filtre" avec maillage nylon.

Les prélèvements osseux après fixation au formol tamponnée à 4% sont décalcifiés par une solution à base d'EDTA (Éthylènediaminetétraacétique) commercialisée par Diapath (Référence : D0053).

Au CHU la préservation du bloc est favorisée par une section minimale invasive, par le réglage manuel du microtome pour chaque bloc et par la confection de lames blanches à la demande du pathologiste.

Pré-analytique du service d'Anatomie et Cytologie Pathologie du Centre François-Baclesse (Tableau 2).

Les prélèvements de type “biopsies” arrivent fixés dans du formol tamponné à 4% au laboratoire, puis sont mis en cassette manuellement avant d’être inclus en paraffine.

Les prélèvements de type “cytoponction” parviennent au laboratoire dans un liquide fixateur (CytoRich™). Après centrifugation, la technicienne réalise 1 à 2 lames de Cytospin™.

Après une nouvelle centrifugation, le culot cellulaire obtenu est fixé en formol tamponné à 4% et est ensuite déposé en gélose 3% avant d’être mis en cassette “filtre” avec maillage nylon.

Les prélèvements osseux après fixation au formol tamponnée à 4% sont décalcifiés par une solution à base d’EDTA à pH neutre Osteosoft™ commercialisée par Merck.

Au centre François Baclesse, la préservation du bloc est favorisée par la conservation de rubans réalisés au moment de la première lame colorée à l’HES (Hémalun, Eosine, Safran) (Figure 12).



Figure 12 : Technique de préservation du bloc par ruban.

Type de prélèvement	Pré-analytique du CHU de CAEN	Pré-analytique du Centre François Baclesse
Cytaponction	Fixation au formol tamponné à 4%, filtration manuelle par cassette filtre nylon	Fixation en CytoRich™, réalisation d'un culot par centrifugation, fixation au formol tamponné à 4% et mise en gélose puis en cassette filtre nylon.
Cytologie	Centrifugation, 1 étalement coloré en MGG et fixation du culot au formol tamponné à 4% et mise en gélose puis en cassette filtre nylon.	Fixation en CytoRich™, réalisation de 1 à 2 lames de Cytospin™ et fixation du culot au formol tamponné à 4% et mise en gélose puis en cassette filtre nylon.
Décalcification	Solution à base d'EDTA D0053 – Diapath.	Solution à base d'EDTA à pH neutre - Ostéosoft™ - Merck.
Coupe au microtome	Réglage manuel du microtome et réalisation de lames blanches	Réalisation et conservation de rubans.

Tableau 2 : Tableau résumant les techniques pré-analytiques des deux sites.

Parcours recherche de fusion ALK et ROS1 et expression PD-L1

Tout au long de l'étude, la recherche de fusion *ALK* et de l'expression de PD-L1 étaient réalisées par les services d'ACP du CFB et du CHU. Pour la fusion *ROS1* du 1^{er} janvier 2019 au 15 janvier 2020 la recherche pour les patients du CFB et du CHU était réalisée uniquement par le service d'ACP du CHU. A partir du 15 janvier, le CFB a mis en place la technique immunohistochimique ROS1 au sein de son service d'ACP pour ne plus avoir à externaliser cette analyse.

Technique IHC du CHU :

Au CHU, la recherche de l'expression de **PD-L1** est réalisée par immunohistochimie sur des lames de 3 µm d'épaisseur associées à un témoin externe de lignées cellulaires commercialisé par Histocyte (Ref-HCL021). L'anticorps utilisé est le 22C3 commercialisé par Dako (Ref- M3653).

La technique mise au point au CHU de Caen avec l'automate Roche Benchmart Ultra est la suivante : démasquage de 92 min par le tampon CC1 Tris et EDTA au pH 8,4 ; dilution au 1/50 en tampon Roche ; temps d'incubation 32 min et révélation avec le kit Optiview selon la procédure recommandée par le fournisseur (Roche-Ventana).

L'interprétation de l'IHC de l'expression de PD-L1 par le pathologiste s'apprécie par un score TPS (score de proportion tumorale) : pourcentage de cellules tumorales positives (marquage membranaire complet ou incomplet quelle que soit l'intensité).

La recherche de fusion **ALK** est réalisée par immunohistochimie sur des lames de 3 µm d'épaisseur associées à un témoin positif externe de cellules de la lignée H2228 commercialisé par ATCC (Ref-CRL-5935). L'anticorps utilisé est le 5A4 commercialisé par Abcam (Ref- ab17127).

La technique mise au point au CHU de Caen avec l'automate Roche Benchmart Ultra est la suivante : démasquage de 92 min par le tampon CC1 Tris et EDTA à pH 8,4 ; dilution de l'anticorps primaire au 1/50 dans un tampon Roche ; temps d'incubation 1h32 et révélation avec le kit Optiview selon la procédure recommandée par le fournisseur (Roche-Ventana).

L'interprétation de l'IHC ALK par le pathologiste est basée sur un algorithme :

- un test IHC ALK de score 3+ (marquage fort et intense des cellules tumorales) suffit pour indiquer une thérapie ciblée.
- un test de score 2+ ou 1+ nécessite de rechercher un réarrangement d'ALK par technique d'hybridation FISH avant la mise en route d'un traitement.
- un test négatif en IHC ne nécessite pas de contrôle FISH et il n'y a pas d'indication de traitement ciblé.

La recherche de fusion **ROS1** est réalisée par immunohistochimie sur des lames de 3 µm d'épaisseur associées à un témoin positif externe de cellules de la lignée cellulaires HCC78 commercialisé par DSMZ (Ref-ACC 563). L'anticorps utilisé est le D4D6 commercialisé par Cell Signaling (Ref- 3287).

La technique mise au point au CHU de Caen avec l'automate Roche Benchmart Ultra est la suivante : démasquage de 64 min par le tampon CC1 Tris et EDTA au pH 8,4 ; dilution au 1/75 en tampon Roche ; temps de contact 32 min et révélation avec le kit Optiview.

L'interprétation de l'IHC ROS1 par le pathologiste est basé sur un algorithme :

- un test IHC ROS1 de score 3+ (marquage fort et intense des cellules tumorales), 2+ ou 1+ nécessite de rechercher un réarrangement de ROS1 par technique d'hybridation FISH avant la mise en route d'un traitement.
- un test négatif en IHC ne nécessite pas de contrôle FISH et il n'y a pas d'indication de traitement ciblé.

Technique IHC du CFB :

Au CFB, la recherche de l'expression de **PD-L1** est réalisée par immunohistochimie sur des lames de 5 µm d'épaisseur associées à un témoin positif externe de rate. L'anticorps utilisé est le QR1 commercialisé par Diagnostics (Quartette) (Ref- 1-PR292-05).

La technique mise au point au CFB avec l'automate Roche-Ventana Benchmart Ultra est la suivante : démasquage de 32 min par le tampon CC1 Tris et EDTA au pH 8,4 ; dilution primaire au 1/100 dans un tampon Roche ; temps d'incubation 32 min et révélation avec le kit Optiview selon la procédure recommandée par le fournisseur (Roche-Ventana).

La recherche de fusion **ALK** est réalisée par immunohistochimie sur des lames de 5 µm d'épaisseur associées à un témoin positif externe de cellules de la lignée MB CC ALK commercialisé par Zytomed (Ref-MB-CC ALK). L'anticorps utilisé est le 1A4 commercialisé par Diagnostics (Origene) (Ref- C0001MA01-MA).

La technique mise au point au CFB avec l'automate Roche-Ventana Benchmart Ultra est la suivante : démasquage de 64 min par le tampon CC1 Tris et EDTA à pH 8,4 ; dilution de l'anticorps primaire au 1/100 dans un tampon Roche ; temps d'incubation 56 min et révélation avec le kit Optiview selon la procédure recommandée par le fournisseur (Roche-Ventana).

La recherche de fusion **ROS1** est réalisée par immunohistochimie sur des lames de 5 µm d'épaisseur associées à un témoin positif externe de cellules de la lignée MB CC ROS1 commercialisé par Zytomed (Ref-MB-CC ROS1). L'anticorps utilisé est le EP282 commercialisé par Diagnostics (BioSB) (Ref- Ref-BSB-3626).

La technique mise au point au CFB avec l'automate Roche-Ventana Benchmart Ultra est la suivante : démasquage de 64 min par le tampon CC1 Tris et EDTA à pH 8,4 ; dilution de l'anticorps primaire au 1/400 dans un tampon Roche ; temps d'incubation 60 min et révélation avec le kit Optiview selon la procédure recommandée par le fournisseur (Roche-Ventana).

E- Technique IDYLLA™ mutation - EGFR

Principe de la technique Idylla™

Depuis 2017, la société Biocartis commercialise un kit aux normes CIVD de détection des mutations de l'EGFR fonctionnant sur un automate nommé Idylla™, couplant l'extraction d'ADN à la recherche de mutation. Cet automate réalise cette analyse en 129 minutes. Les cartouches du test EGFR sont prêtes à l'emploi et contiennent les réactifs nécessaires pour effectuer la préparation des échantillons, la détection et l'amplification PCR multiplex en temps réel, à partir de coupes de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE).

Le logiciel Idylla™™ EGFR (TTP EGFR) analyse automatiquement les données de PCR obtenues.

L'Idylla™™ EGFR Mutation Test détecte trois mutations ponctuelles différentes : p.G719S (c. G2155A), p.G719C (c. G2155T), p.G719A (c.G2156C) dans l'exon 18 ; six familles différentes de délétions allant de 9 à 24 pb dans l'exon 19 ; cinq insertions différentes (p.InsASV9, p.InsASV11, p.InsSVD, p.InsG, p.InsH) et deux mutations ponctuelles p.S768I (c.G2303T) et p.T790M (c.C2369T) dans l'exon 20 et les mutations p.L858R (c.T2573G) et p.L861Q (c.T2582A) dans l'exon 21 soit plus de 97% des mutations connues de l'EGFR (23). (Liste des mutations détaillées en annexe 2.)

Description de la console Idylla™

L'appareil Idylla™ est constitué d'un écran tactile, appelé *Console*, relié à un ou plusieurs *Instruments* (Figure 13). La console pilote les différents instruments. Un instrument permet d'analyser une cartouche Idylla™ à la fois.

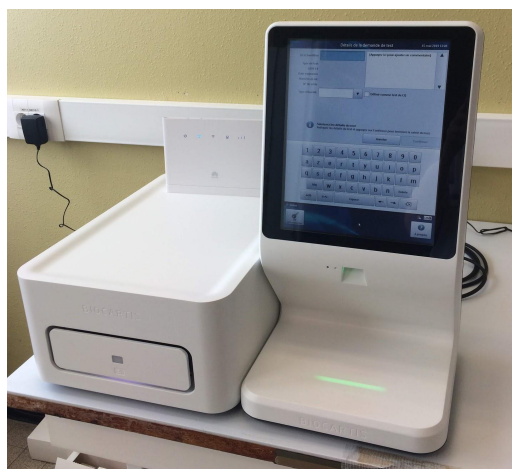


Figure 13 : Un instrument et la console Idylla™.

Description de la cartouche Idylla™

Chaque cartouche EGFR à usage unique est emballée individuellement et est identifiée par un code barre qui une fois scanné, assure la vérification de sa date de validité, l'identification du prélèvement et qui permet de programmer automatiquement l'instrument. Une fois que les copeaux FFPE sont introduits dans la cartouche, cette dernière est insérée dans l'instrument. Toutes les étapes techniques, de l'extraction à la révélation, se passent au sein de la cartouche. Il n'y a ainsi aucun risque de contamination de l'instrument par les amplicons obtenus.

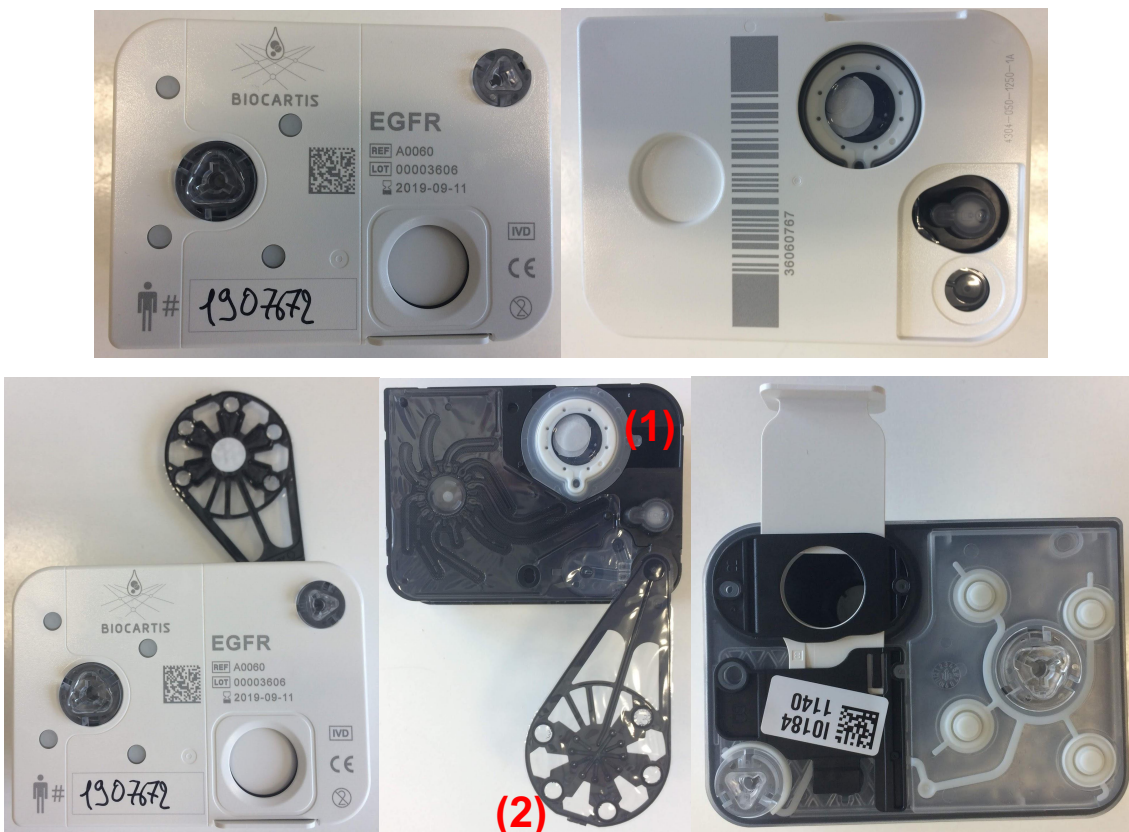


Figure 14 : Cartouche Idylla™

(1) visualisation de la membrane de lyse et (2) des 5 puits de PCR.

Chambre de lyse et d'extraction :

Les copeaux FFPE sont déposés sur une membrane souple transparente qui se situe au fond de la chambre de lyse et d'extraction (Figure 14.1). La combinaison de réactifs chimiques, d'enzymes, de chaleur et d'ultrasons focalisés de haute intensité (UFHI) induit rapidement le déparaffinage, la désintégration du tissu et la lyse cellulaire afin de libérer l'ADN.

Purification de l'ADN extrait :

La surface de la cartouche est dotée de deux puits de connexion, un des puits distribue le produit d'extraction dans différents circuits pour la purification. Une fois la purification réalisée, l'ADN est acheminé dans un puit comportant le mélange réactionnel d'amplification.

PCR multiplex :

Le mélange réactionnel est acheminé par un capillaire et est distribué dans les cinq puits où se déroulent les PCR multiplex (Figure 14.2). La technique Idylla™ utilise le système PlexPrimer/PlexZyme de la société SpeedX (Figure 15).

Le système PlexPrimer augmente la spécificité de la détection d'un variant en insérant au sein de l'amplicon, en amont de la mutation, une séquence unique d'une dizaine de nucléotide. Cet amplicon est ciblé par le système PlexZymes, doté d'une sonde unique qui reconnaît la séquence insérée avec le variant et d'une seconde sonde reconnaissant la suite de l'amplicon. Les deux sondes acquièrent en s'unissant une activité catalytique et sont reconnues par une troisième sonde, dite "universelle", couplée à un fluorochrome et à un désactivateur (quencher). Une fois la sonde clivée par l'activité catalytique, le fluorochrome est éloigné du désactivateur, et le système Idylla™ détecte la fluorescence émise. Dans chacun des puits, le système Idylla™ peut détecter 5 sondes universelles différentes. Les sondes PlexPrimer/PlexZyme permettent au système Idylla™ de détecter spécifiquement 51 mutations avec seulement 5 chambres d'amplification et 5 couleurs détectées.

Pour placer les 5 puits sous les cellules de mesure de fluorescence de l'instrument Idylla™, le second puits de connexion présent à la surface de la cartouche (Figure 14.2), assure la rotation du bras.

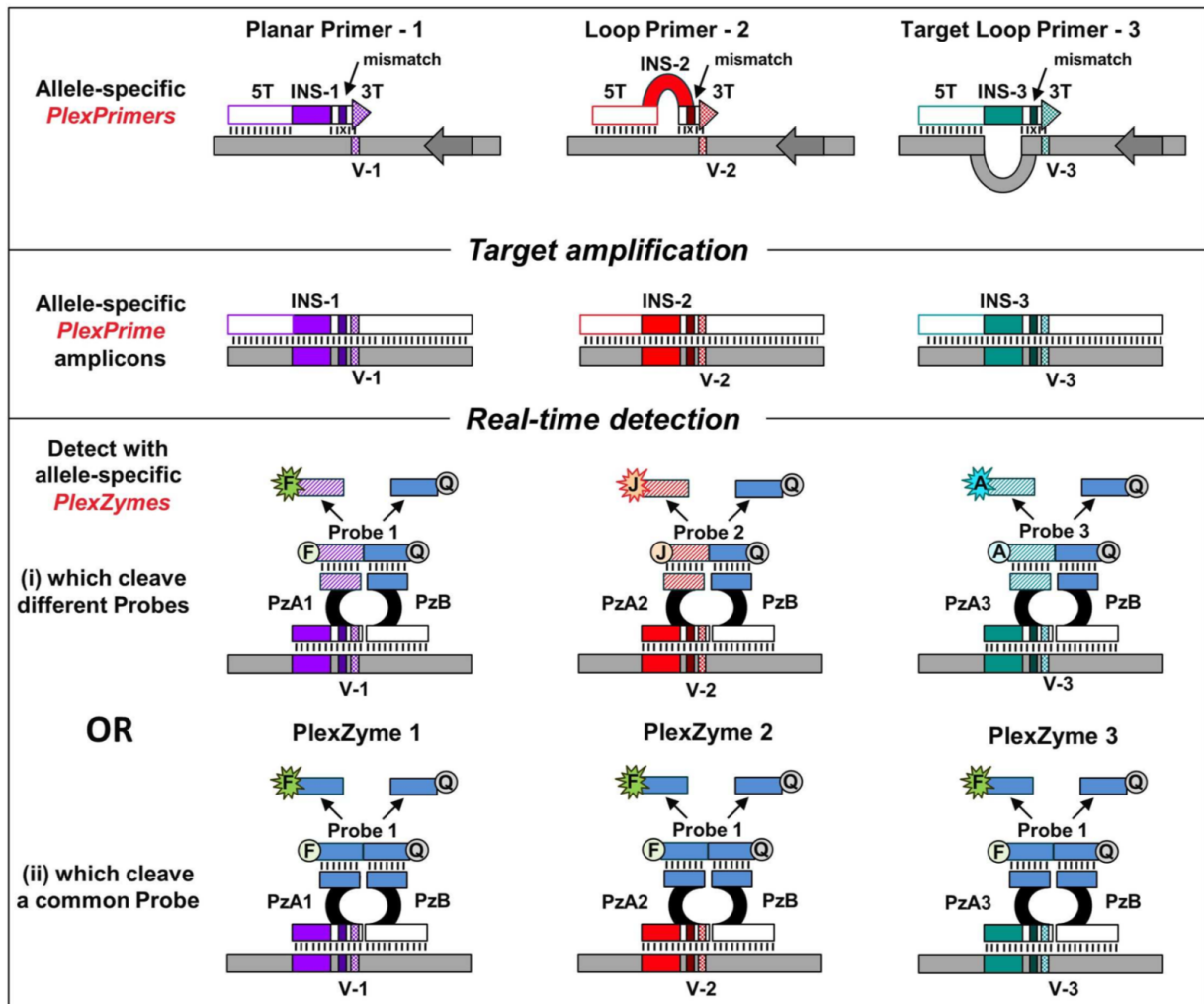


Figure 15 : Système PlexPrimer et PlexZyme de la société SpeedX.
Schéma de TAN et al. 2017 (24).

Validation du test EGFR Idylla™ par le logiciel

Le logiciel Idylla™ EGFR (TTP EGFR) analyse automatiquement les signaux fluorescents obtenus et calcule une valeur de cycle de quantification (Cq) pour chaque courbe d'amplification. Dans chacun des cinq puits d'amplification, une PCR de contrôle ciblant un fragment préservé de la zone transmembranaire du gène *EGFR* permet (i) un contrôle de la technique, (ii) permet de mesurer la quantité d'ADN amplifiable dans l'échantillon et (iii) l'analyse des mutations de l'échantillon. La moyenne des cinq Cq des PCR de contrôle est calculée et correspond au CQ du contrôle EGFR donné dans le rapport de la console Idylla™.

La société Biocartis préconise un CQ du contrôle EGFR proche de 22 pour considérer que l'échantillon et la technique soient valides.

La présence d'un génotype mutant est déterminée en calculant la différence entre la valeur Cq de l'*EGFR* et la valeur Cq obtenue pour les signaux mutants. Cette différence est appelée ΔCq .

Le système Idylla™ valide les mutations détectées à l'aide du ΔCq . Au-delà d'un seuil de ΔCq fixé par Biocartis et non communiqué, l'amplification est jugée non spécifique et non valide. Biocartis recommande d'avoir un Cq de l'*EGFR* inférieur ou proche de 22 pour considérer la technique valide.

A l'écran de la console, les résultats sont rendus sous forme de tableau (Figure 16), listant les génotypes avec le résultat de la présence ou non d'une mutation et le CQ du contrôle *EGFR*.

A

Résultat du Test (1) Dispositif de Diagnostic Médical In Vitro. Utilisation réservée aux procédures de diagnostic.

Idylla™ EGFR Mutation Test

GÉNOTYPE EGFR	
L858R	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
SUPPRESSION DE L'EXON 19	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
T790M	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
G719A/C/S	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
INSERTION DE L'EXON 20	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
S768I	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
L861Q	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
CQ DU CONTRÔLE EGFR	24.7

B

Résultat du Test (1) Dispositif de Diagnostic Médical In Vitro. Utilisation réservée aux procédures de diagnostic.

Idylla™ EGFR Mutation Test

GÉNOTYPE EGFR	
L858R	MUTATION DÉTECTÉE
Changement de protéine	p.Leu858Arg
Changement de nucléotide	c.2573T>G,c.2573_2574delinsGT,c.2573_2574delinsGA
SUPPRESSION DE L'EXON 19	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
T790M	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
G719A/C/S	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
INSERTION DE L'EXON 20	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
S768I	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
L861Q	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
CQ DU CONTRÔLE EGFR	22.2

Figure 16 : Résultats affichés sur la console Idylla™.

A : échantillon ne comportant pas de mutation de l'*EGFR* ; B : échantillon comportant une mutation L858R, exon 21 de l'*EGFR*.

Interface Idylla™ Explore

La console Idylla™ est reliée au réseau et transmet les résultats de manière anonyme à une interface développée par la société Biocartis appelée « Idylla™ Explore » (Figure 17). Notre équipe de pathologie moléculaire a accès à ce service sécurisé, où tous les tests sont répertoriés de façon anonyme. A partir de cette plateforme, nous avons accès aux courbes de fluorescence de chaque puits.

A

The screenshot shows the Idylla Explore interface. At the top, there's a header with the logo, 'RUNS', version '3.1.1526.0', and user 'levallet-g@chu-caen.fr'. Below is a 'Runs' section with a table of results:

Status	Sample ID	Test Type	Run Date	Results
✓	1906813	EGFR_IVD/1.0	18 Apr 2019 11:09:44	EGFR GENOTYPE: L858R: NO MUTATION DETECTED
✓	1906465	EGFR_IVD/1.0	17 Apr 2019 08:53:42	EGFR GENOTYPE: EXON 19 DELETION: MUTATION DETECTED

The detailed view for run 1906465 shows 'TARGET RESULTS' and 'TEST RESULTS' tables, and 'Curves' for wells A-E.

TARGET	CHAMB.	CQ	ΔCQ
● Del 15	B	23.25	4.74
● EGFR Total	A	18.21	-
● EGFR Total	B	18.50	-
● EGFR Total	C	18.59	-
● EGFR Total	D	18.32	-
● EGFR Total	E	18.30	-

The 'Curves' section shows five graphs (A-E) of fluorescence vs cycles. A metadata table is also present:

Sample ID	1906465	Instrument	SER1822
Test Type	EGFR_IVD/1.0	Console	C00001219
Cartridge ID	36060728	Run Date	17 Apr 2019 08:53:42
Lot ID	00003606	Operator	demo
Location	Centre Hospitalier Universitaire de C...	Customer	Centre Hospitalier Universitaire de C...
Label(s)			

B

The screenshot shows a detailed view of the fluorescence curves for run 1906465. The y-axis is 'FLUORESCENCE' (0-20) and the x-axis is 'CYCLES' (0-60). The curves show a characteristic sigmoidal shape for the 'Del 15' target (well B) and a lower, more stable signal for the 'EGFR Total' targets (wells A, C, D, E).

Below the curves, the 'Run details' section shows the following target results:

TARGET	CQ	ΔCQ
● EGFR Total	18.21	-
● Del 15	23.25	4.74
● EGFR Total	18.50	-
● EGFR Total	18.59	-
● EGFR Total	18.32	-
● EGFR Total	18.30	-

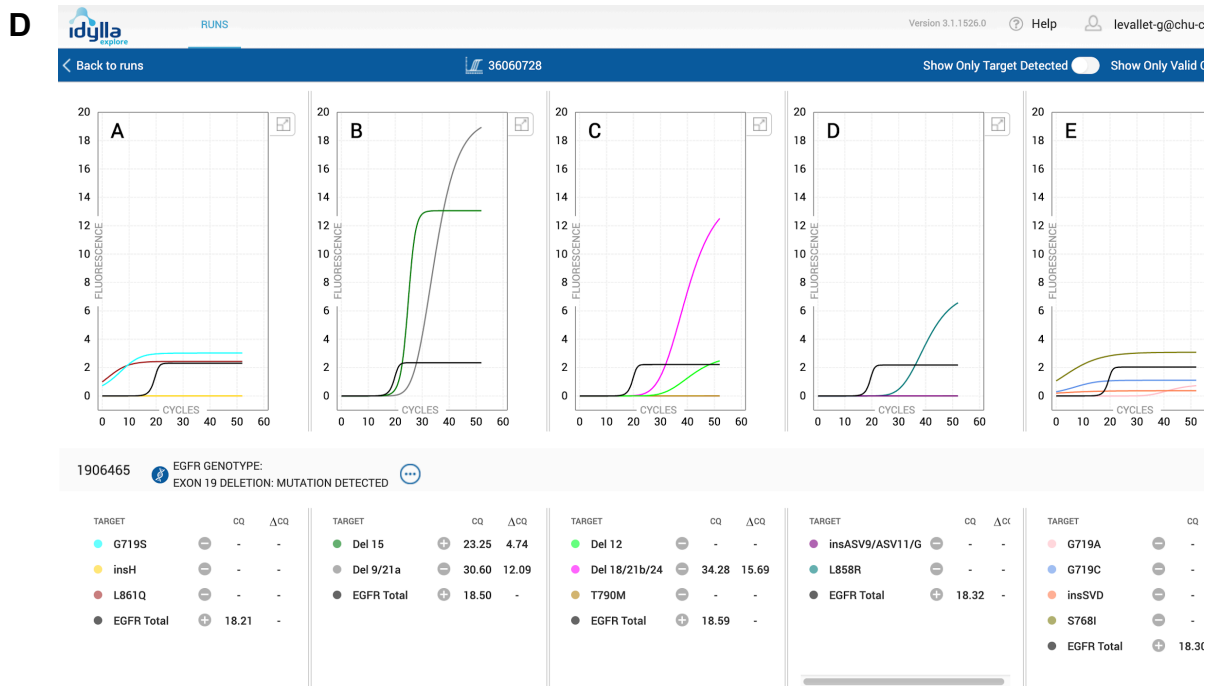
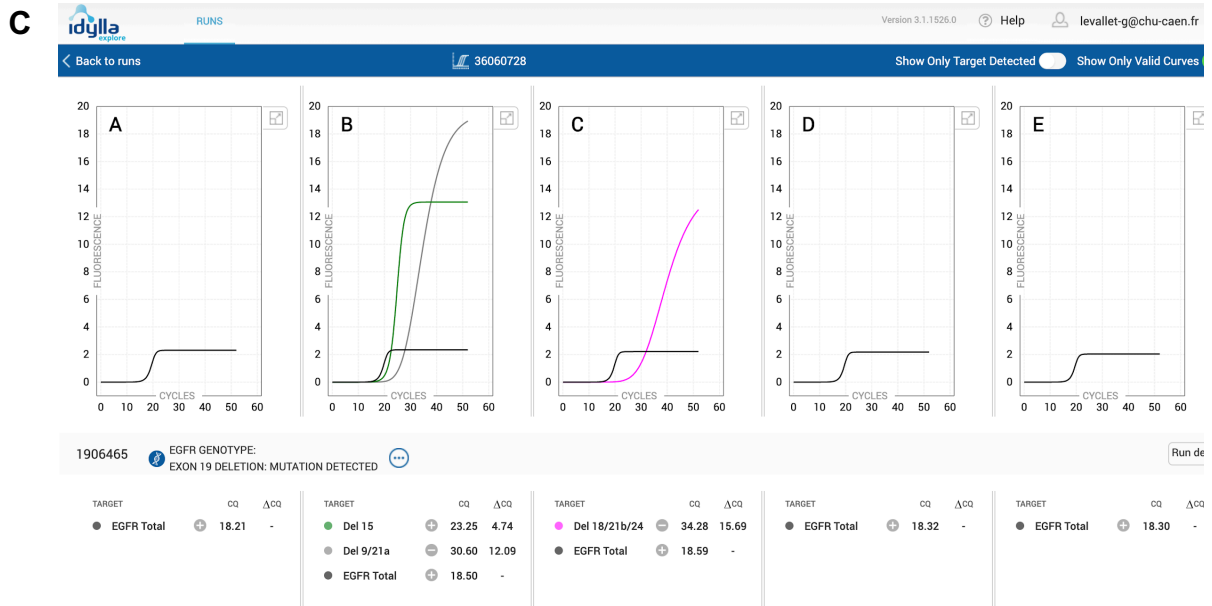


Figure 17 : Interface Idylla™ Explore.

A : Vue rapide d'un test, tableau de synthèse des résultats et courbes d'amplification.

B, C et D : Vue détaillée des courbes de fluorescence de chaque puits ;

B : "Show only target detected" et "Show only valid curves" Amplifications validées par le système Idylla™ ;

C : "Show only target detected" Courbes d'amplifications détectées ;

D : Toutes amplifications ou fluorescences détectées.

Évaluation de la quantité de matériel minimale pour la recherche de mutation de l'EGFR.

Pour la validation de la technique Idylla™ EGFR, Biocartis recommandait de ne pas dépasser une quantité de matériel : soit une surface totale d'échantillon maximale de 2000 mm² pour les coupes de tissu inclus en paraffine (FFPE) de 5µm ou une surface totale d'échantillon maximale de 1000 mm² pour les coupes de tissu FFPE de 10 µm (Figure 18).

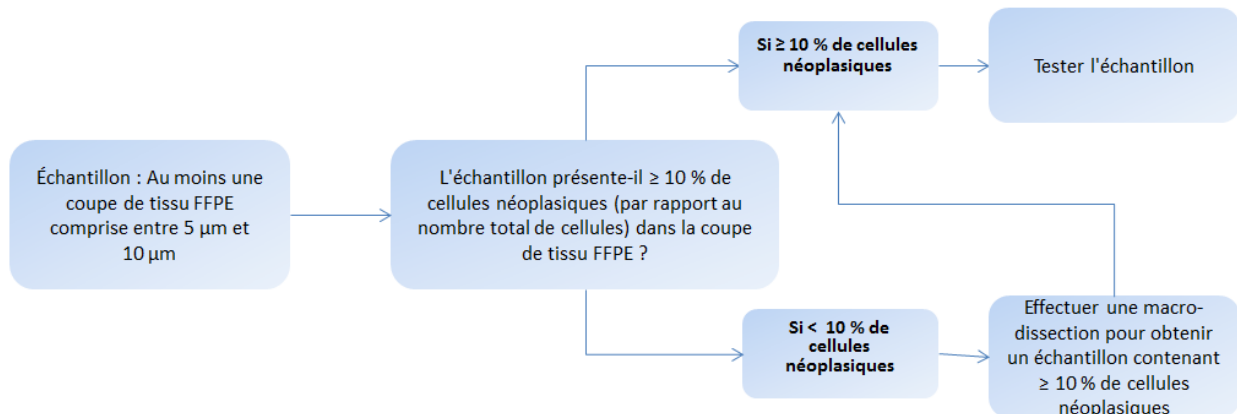


Figure 18 : Critères recommandés pour la sélection des échantillons de l'Idylla™ EGFR Mutation Test.

Arbre décisionnel de Nv et Wittelaan (25).

Au sein de notre laboratoire, afin de préserver le matériel, nous avons réalisé 5 tests rétrospectifs sur des prélèvements dont nous connaissons le statut mutationnel de l'EGFR qui avait été établi par analyse préalable par NGS, et ce afin d'évaluer la quantité de matériel minimale requise pour la détection d'une mutation de l'EGFR par la technique Idylla™, avec un CQ contrôle EGFR proche de 22.

Les mutations des 4 échantillons testés ont été détectées par la technique Idylla™, le prélèvement N°1 a été testé deux fois et nous a permis de connaître la quantité minimale de copeaux à utiliser pour permettre une détection.

L'échantillon A est un prélèvement de type "cytoponction" avec une cellularité estimée à environ 300 cellules et 30% de cellules tumorales sur les coupes HES avant réalisation des copeaux. La recherche de mutation EGFR par la technique NGS, avait mis en évidence une délétion de l'exon 19 (c.2235_2249del ; p.(Glu746_Ala750del)) avec une fréquence du variant allélique (VAF) à 2,8%.

La quantité du matériel du premier test, 2 coupes FFPE à 5µm, n'a pas permis de détecter la délétion de l'exon 19 par le système Idylla™. L'analyse détaillée des courbes sur Idylla™ Explore mettait toutefois en évidence une courbe d'amplification DEL 15 non validée, correspondant à la délétion de l'exon 19 avec un CQ contrôle EGFR de 35.56 et un Δ CQ à 10.86, soit suggérant un matériel insuffisant lors de cette analyse (Figure 19, Tableau 3)

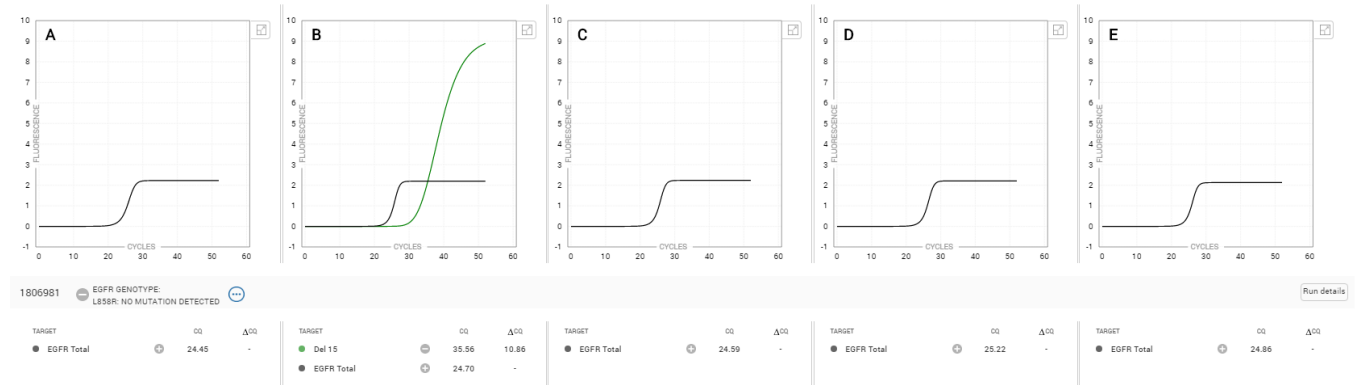


Figure 19 : Résultats Test 1 échantillon n°1.

Mise en évidence d'une courbe d'amplification nommée DEL15 par la technique Idylla™, qui détecte entre autres la délétion c.2235_2249del.

Dans un second temps, sur le même échantillon A, nous avons testé une quantité de matériel de 4 coupes FFPE à 10µm. La mutation DEL19 a été détectée et validée par la technique avec un CQ du contrôle de l'EGFR à 25,3 et un Δ Cq à 6,67. (Figure 20, Tableau 3).

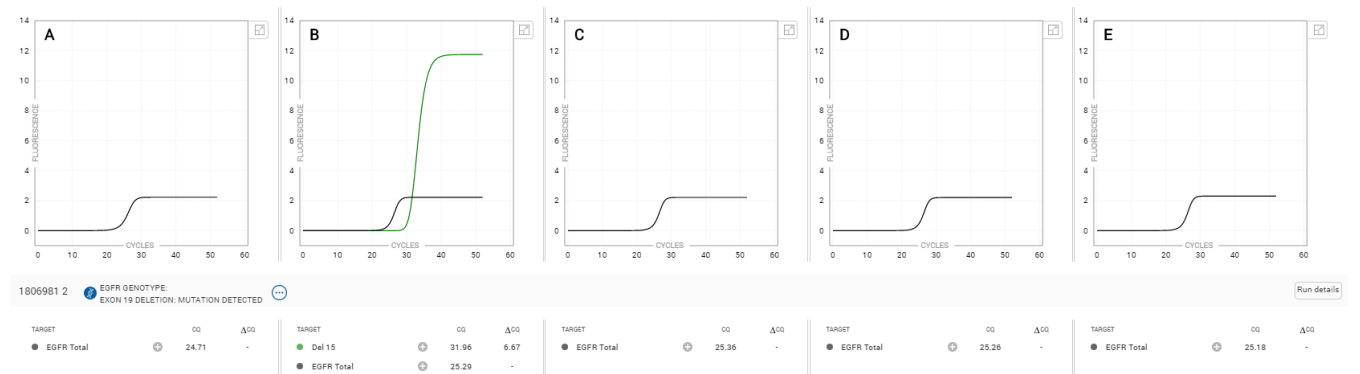


Figure 20 : Résultats test 2 échantillon n°1.

Courbe d'amplification validée nommée DEL15 par la technique Idylla™, qui détecte entre autres la délétion c.2235_2249del.

Nos tests rétrospectifs ont également porté sur des prélèvements type biopsie bronchique. Nous avons testé deux biopsies, échantillon B et C, comportant respectivement 30 et 10 % de cellules tumorales avec un VAF respectif de 3,7 et 12,3

%. Avec une quantité de matériel de 4 coupes FFPE à 10 µm pour l'échantillon n°2 et 6 coupes FFPE à 10 µm pour l'échantillon n°3. Les deux tests ont permis de mettre en évidence les mutations connues avec des CQ contrôle de l'EGFR de respectivement, 22 et 24,3 et un ΔCq de 4,58 et 4,69 (Tableau 3).

Pour finir, nous avons testé un échantillon situé en dessous du seuil de sensibilité défini par Biocartis. L'échantillon D était en effet, un prélèvement de type biopsie, comportant 5% de cellules tumorales avec un VAF de 2%. Une quantité de matériel de 6 copeaux à 10 µm a permis de détecter la mutation avec un CQ de contrôle à 22,4 et un ΔCq de 6,95 (Tableau 3).

Cas	Type	% CT	Quantité de matériel	CQ contrôle EGFR / ΔCq	Validation Idylla™™	Résultat NGS	VAF %
A	Cytoponction	30%	2 coupes FFPE 5 µm	27,7/10,86	WT	EGFR_ex19 p.(E746_A750del)	2.8
A bis	Cytoponction	30%	4 coupes FFPE 10µm	25,3/6,67	DEL 15	EGFR_ex19 p.(E746_A750del)	2.8
B	Biopsie	30%	4 coupes FFPE 10µm	22 / 4,58	L858R	EGFR_ex21 (L858R)	3.7
C	Biopsie	10%	6 coupes FFPE 10µm	24,3/ 4,69	DEL 15	EGFR_ex19 p.(E746_A750del)	12.3
D	Biopsie	5%	4 coupes FFPE 20 µm	22,4 / 6,95	L861Q	EGFR_ex21 (p.L861Q)	2

Tableau 3 : Récapitulatif des 5 tests rétrospectifs pour estimer la quantité minimale de copeaux FFPE au sein de notre laboratoire.

WT (Wild Type) : *EGFR* sauvage, non muté.

Notre second objectif était de standardiser le nombre de copeaux à réaliser entre chaque échantillon et avec la quantité de matériel nécessaire pour l'extraction d'ADN en vue de l'analyse NGS.

Nous avons conclu que 4 coupes à 15 µm ou 3 coupes à 20 µm (plus facile à manipuler et introduire dans les cassettes Idylla™), permettaient la détection des mutations à la fois des cytoponctions et des biopsies et étaient la quantité déjà préconisée pour l'extraction d'ADN en vue de l'analyse NGS.

Réalisation en routine de la recherche des mutations de l'EGFR par la technique Idylla™

L'automate Idylla™ est simple d'utilisation, le temps technicien est estimé à environ 5 à 10 min par patient. Les copeaux sont disposés entre deux filtres humidifiés afin de les insérer facilement dans la cartouche identifiée. Puis celle-ci est introduite dans l'instrument et l'analyse démarre (Figure 21).

La manipulation est détaillée en annexe 3 : fiche technique Idylla™ mutation EGFR.

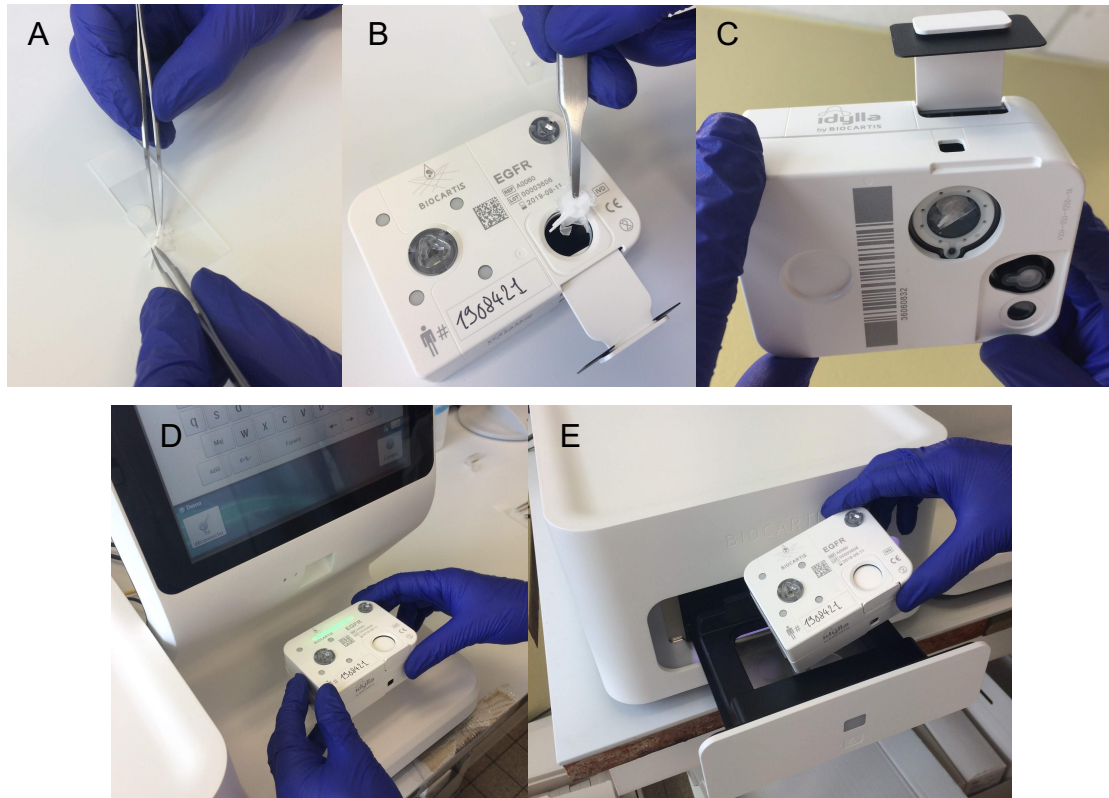


Figure 21 : Différentes étapes du temps technicien de la technique Idylla™.

A : dépôt des copeaux FFPE entre deux filtres humides, B : introduction des copeaux FFPE avec filtres au sein de la chambre de lyse, C : vérification des copeaux au contact du tampon de lyse situé au fond de la chambre, D : présentation et scanne du code barre de la cartouche E : introduction de la cartouche dans le bac.

Validation et rédaction du compte rendu

Quand l'analyse Idylla™ est terminée, *via* la console ou *via* Idylla™ explore nous avons accès au tableau de résultat avec le Cq de contrôle de l'EGFR. A partir de la plateforme Idylla™ explore, nous regardons le profil des courbes et notamment si nous avons des courbes d'amplification non validées avec un Delta Cq proche de 10. Nous prenons cette précaution pour éviter les faux négatifs, et si le cas se présente nous mettons des réserves sur le résultat.

F- Technique NGS

L'analyse NGS du CHU de Caen est réalisée par le service de génétique.

L'extraction des acides nucléiques est réalisée avec l'automate Maxwell®, à partir de 4 coupes à 15µm FFPE. La technique d'extraction se déroule sur une nuit et un jour à en utilisant le kit Maxwell CSC DNA FFPE Kit (réf : 2852120).

La préparation des librairies se fait manuellement sur 2 jours une fois par semaine, jeudi-vendredi, par deux techniciens, pour prévenir toute erreur de manipulation, qui utilisent la méthode par amplification et préparent le panel CLv3 (Colon and Lung Cancer Panel v3) commercialisé par thermofisher. Une quantité de 10 ng est utilisée, et le nombre de librairie préparée est non limité.

L'appareil utilisé pour l'amplification et le chargement de la puce est l'automate Ion Chef de thermofisher. L'amplification se déroule dans la nuit du lundi, pour ensuite insérer la puce dès le mardi matin dans le séquenceur Ion GeneStudio S5 series. Les reads alignés sur le génome de référence sont disponibles dès le mercredi matin. Les résultats analysés par le biologiste sont rendus le plus souvent le jeudi soir.

Pour l'analyse des données générées par le panel CLv3, deux pipelines différents sont utilisés : Torrent suite 5.6 et Nextgene (Softgenetics) afin d'écarter l'identification artéfactuelle d'un variant (toute mutation identifiée dans un prélèvement doit être mise en évidence par ces deux pipelines).

La profondeur moyenne est supérieure à 500X, la limite de détection est de 3% pour les mutations ponctuelles et 5% pour les insertions/délétions avec une profondeur minimale de 100X par amplicon.

G- Estimation du coût

Sans compter le prix des automates (mis à disposition) et le temps technicien, l'analyse Idylla™ pour un patient coûte environ 180 euros, le prix de la cartouche EGFR. Concernant le NGS, en ne comptant que le prix des réactifs, la technique revient à environ 450 euros par patient.

H- Analyses statistiques

Évaluation de la population

Pour analyser notre population nous avons comparé la répartition homme/femme, le statut tabagique et l'âge des patients entre les deux centres et entre les patients mutés et non-mutés à l'aide d'un test du khi² et d'un test non paramétrique pour données non appariées de Mann-Whitney.

Évaluation de la concordance

Pour évaluer les performances diagnostiques de la technique Idylla™ EGFR par rapport à la technique NGS nous avons calculé les pourcentages de concordance totale, positive et négative (26).

Évaluation du délai de technique Idylla™ NGS

Afin de comparer les délais d'analyse des deux méthodes (temps entre la date de prélèvement et la date de résultat), nous avons colligé pour chaque patient la date du prélèvement, la date de résultat du compte rendu par technique Idylla™ et la date du résultat du compte rendu par technique NGS. Nous avons calculé la moyenne et l'écart-type (SD) des délais pour chaque technique et comparé les délais en jours ouvrés et en jours calendaires à l'aide du test non paramétrique pour données appariées de Wilcoxon.

Évaluation du bénéfice pour le patient

Le bénéfice pour le patient de la recherche rapide du statut EGFR par technique Idylla™ a été apprécié chez les patients EGFR mutés en colligeant la date de RCP et

la date de la mise sous traitement par ITK. Nous avons calculé et comparé les délais en jours ouvrés par rapport à la date du compte rendu par technique Idylla™.

Évaluation de la consommation du matériel

Après réalisation des copeaux FPPE pour la technique NGS puis la technique Idylla™, nous avons réalisé une lame HES afin d'évaluer le pourcentage de cellules tumorales restantes sur le bloc. Nous avons calculé le pourcentage d'échantillon pour lequel la cellularité tumorale était inférieure ou égale à 5% afin d'estimer les échantillons sur lesquels d'autres analyses complémentaires ne peuvent pas être envisagées. Nous avons comparé la cellularité tumorale avant et après réalisation des copeaux à l'aide du test de Wilcoxon. Enfin nous avons comparé la cellularité tumorale après biologie moléculaire des échantillons du CHU *versus* du CFB à l'aide du test de Mann-Whitney.

Évaluation du délai technique et d'interprétation de l'expression de PD-L1 et des recherches de fusions ALK et ROS1.

Le statut PD-L1, *ALK* et *ROS1* sont avec le statut EGFR requis pour l'initiation du traitement. Nous avons colligé pour chaque patient la date du prélèvement et la date à laquelle le statut PD-L1, *ALK* et *ROS1* sont validés par le pathologiste. Nous avons calculé la moyenne et l'écart-type (SD) des délais d'analyse en jours ouvrés et en jours calendaires par rapport aux résultats du statut EGFR par technique Idylla™ et NGS. Nous avons comparé les délais d'analyse entre le CHU et le CFB à l'aide du test de Mann-Whitney.

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de Microsoft Excel version 16.47.1 et du logiciel Graphpad PRISM version 8.4.2.

III- Résultats

A- Caractéristiques de la population des patients de l'étude ID-MUT :

	Total (n=201)	CHU (n=63)	CFB (n=138)	p value CHU/CFB	Patients mutés (n=25/ 12,4 %)	p value M/WT
Population						
Homme	113 (56,2%)	39 (61,9%)	74 (53,6%)	p = 0,27	8 (32,0%)	p = 0,009
Femme	88 (43,8%)	24 (38,1%)	64 (46,4%)		17 (68,0%)	
Âge (moyenne)	65,6	64,2	66,2	p = 0,21	65,8	p = 0,05
Statut tabagique						
Non-fumeur	34 (16,9%)	9 (14,3%)	25 (18,1%)	p = 0,16	15 (60,0%)	p < 0,0001
Petit fumeur (≤ 10 PA)	9 (4,5%)	2 (3,2%)	7 (5,1%)		4 (16,0%)	
Gros fumeur (>10 PA)	156 (77,6%)	50 (79,4%)	106 (76,8%)		6 (24,0%)	
Non connu	2 (1,0%)	2 (3,2%)	0		0	
Histologie - OMS 2015 4ème édition						
Adénocarcinome	148 (73,6%)	42 (66,7%)	106 (76,8%)		22 (88,0%)	
CBPNPC NOS	27 (13,4%)	11 (17,5%)	16 (11,6%)		0	
CBPNPC en faveur d'un ADK	20 (10,0%)	10 (15,9%)	10 (7,2%)		3 (12,0%)	
Carcinome épidermoïde	4 (2,0%)	0	4 (2,9%)		0	
Tumeur carcinoïde	1 (0,5%)	0	1 (0,7%)		0	
Carcinome à petites cellules & adénocarcinome composés	1 (0,5%)	0	1 (0,7%)		0	
Stades – TNM 8^{ème} édition						
I A	4 (2,0%)	2 (3,2%)	2 (1,4%)		1 (4,0%)	
I B	3 (1,5%)	2 (3,2%)	1 (0,7%)		0	
II A	2 (1,0%)	1 (1,6%)	1 (0,7%)		1 (4,0%)	
II B	4 (2,0%)	2 (3,2%)	2 (1,4%)		0	
III A	18 (9%)	4 (6,3%)	14 (10,1%)		2 (8,0%)	
III B	9 (4,5%)	4 (6,3%)	5 (3,6%)		0	
III C	3 (1,5%)	0	3 (2,2%)		0	
IV A	47 (23,4%)	10 (15,9%)	37 (26,8%)		7 (28,0%)	
IV B	111 (55,2%)	38 (60,3%)	73 (52,9%)		14 (56,0%)	

	Total (n=201)	CHU (n=63)	CFB (n=138)	Patients mutés (n=25/ 12,4 %)
Type de prélèvement				
Biopsie par fibroendoscopie	81 (40,3%)	38 (60,3%)	43 (31,2%)	9 (36,0%)
Cytoponction	44 (21,9%)	19 (30,2%)	25 (18,1%)	5 (20,0%)
Biopsie par scanner	41 (20,4%)	0	41 (29,7%)	6 (24,0%)
Biopsie par échographie	28 (13,9%)	2 (3,2%)	26 (18,8%)	3 (12,0%)
Biopsie chirurgicale	5 (2,5%)	3 (4,8%)	2 (1,4%)	1 (4,0%)
Cytologie	2 (1,0%)	1 (1,6%)	1 (0,7%)	1 (4,0%)
Site biopsique				
Poumon	103 (51,2%)	42 (66,7%)	61 (44,2%)	12 (48,0%)
Adénopathie	51 (25,4%)	18 (28,6%)	33 (23,9%)	6 (24,0%)
Métastase osseuse	20 (10,0%)	1 (1,6%)	19 (13,8%)	5 (20,0%)
Métastase pleurale	5 (2,5%)	1 (1,6%)	4 (2,9%)	1 (4,0%)
Métastase autres localisations	21 (10,4%)	0	21 (15,2%)	1 (4,0%)
Métastase cérébrale	1 (0,5%)	1 (1,6%)	0	0
Technique mutation EGFR				
Idylla™				
Validé par le biologiste	196 (97,5%)	61 (96,8%)	135 (97,8%)	25 (100%)
Non interprétable par le biologiste	4 (2,0%)	2 (3,2%)	2 (1,4%)	0
Non validé par Idylla™	1 (0,5%)	0	1 (0,7%)	0
NGS				
Validé par le biologiste	198 (98,5%)	63 (100%)	135 (97,8%)	25 (100%)
Non contributif	3 (1,5%)	0	3 (2,2%)	0

Tableau 4 : Caractéristique de la population des patients de l'étude ID-MUT.

M : patients mutés EGFR

WT : (Wild type) patients non mutés EGFR

PA = unité de mesure paquet-année : (nombre de cigarettes fumées par jour ÷ 20) X nombre d'années de tabagisme).

L'étude a inclus 201 patients, 63 patients du CHU et 138 patients du CFB (Tableau 4) ; 113 hommes (56,2%) et 88 femmes (43,8%) avec une moyenne d'âge au diagnostic de 65,6 ans (36-89 ans).

Pour ces patients, nous disposons de 150 prélèvements biopsiques (77,6%), 46 cytoponctions (22,9%) et 5 biopsies chirurgicales (2,5%). Le type histologique le plus représenté était l'adénocarcinome (73,6%) selon la classification OMS 2015. 158 (78,6%) patients présentaient une maladie métastatique, stade IV au moment du diagnostic.

Les prélèvements tumoraux des 201 patients retenus pour cette étude ID-MUT ont pu être analysés à la fois par la technique Idylla™ et NGS. Concernant la technique Idylla™ : 200 (99,5%) analyses ont été validées par le logiciel Idylla™ et 196 (97,5%) par le biologiste. En effet, 4 prélèvements (2,0%) présentait un CQ de contrôle de l'EGFR supérieur ou égal à 26 et ont été évalués par le biologiste comme « non interprétables ». La console Idylla™ avait rapporté un problème technique pour le seul prélèvement non validé automatiquement par le logiciel Idylla™.

Concernant la technique NGS, 3 prélèvements (1,5%) ont été validés comme « non contributifs » par le biologiste, l'ADN de ces derniers n'ayant pas pu être amplifié.

Au final, un seul patient n'a pas pu bénéficier de l'analyse moléculaire du gène *EGFR* à la fois par NGS et par Idylla™.

Sur les 201 patients inclus, 25 (12,4%) patients présentaient une mutation de l'EGFR, avec une majorité de femmes (n=17 (68,0%) ; p value = 0,009) et une majorité de non-fumeurs (n=15, (60%) ; p value < 0,0001).

B- Concordance entre les résultats du statut mutationnel de l'EGFR déterminés par technique de l'Idylla et la méthode de référence (NGS)

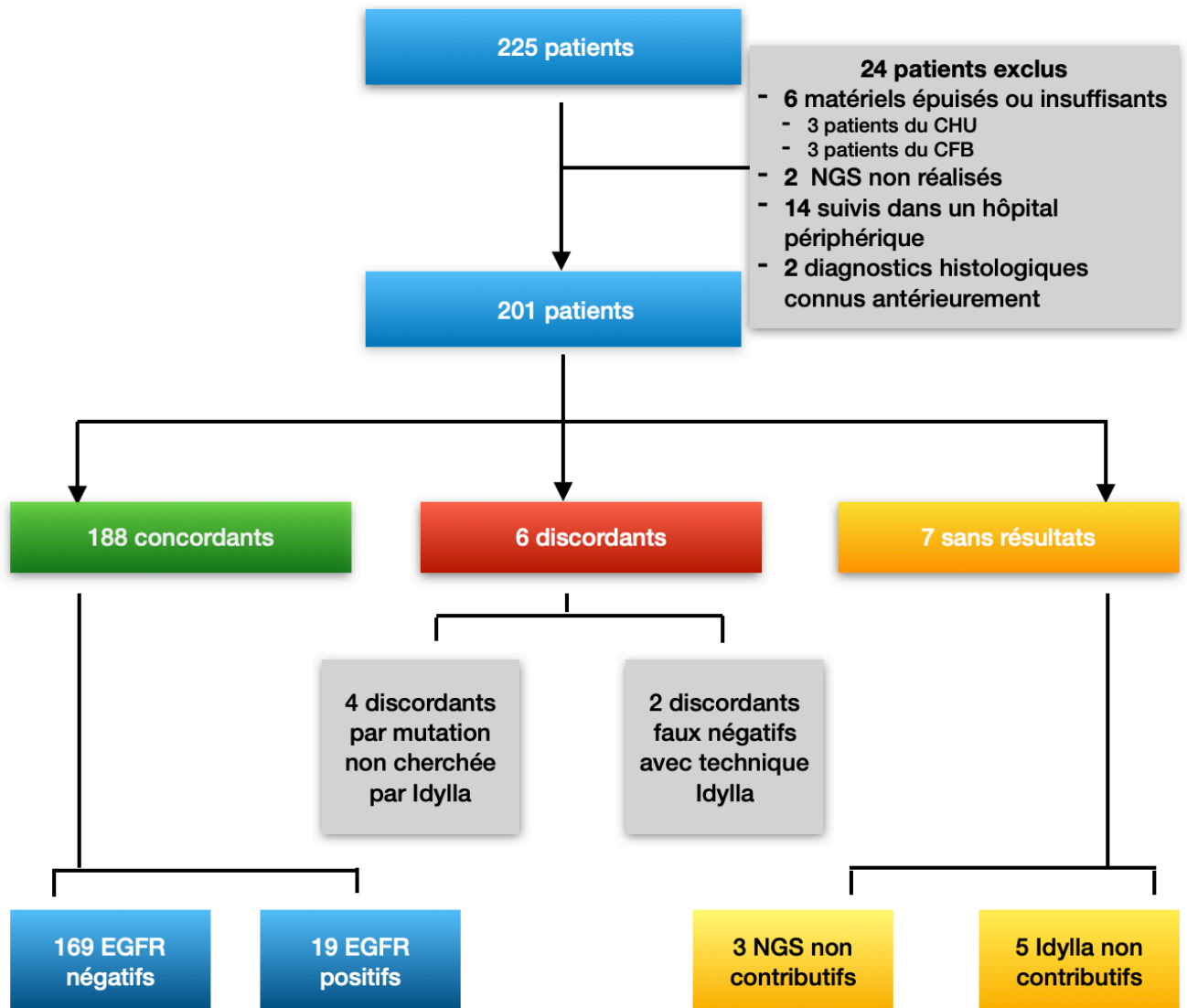


Figure 22 : Flow chart avec détails des résultats Idylla™ et NGS.

		NGS - résultats EGFR											
Idylla™ EGFR	EGFR	DEL Ex19	Q787P/ T790M	V774L	L858R	DEL Ex19/ V769M	L861Q	E711V	Ins Ex20	V774M	DELIns EX19	Aucune mutation détectée	Totaux
	DEL Ex19	9				1							10
	T790M		1										1
	L858R				7								7
	Ins EX20								1				1
	Aucune mutation détectée	1		1			1	1		1	1	169	175
	Totaux	10	1	1	7	1	1	1	1	1	1	169	194

Tableau 5 : Résultats du statut mutationnel de l'EGFR par technique Idylla™ comparés à la méthode de référence (NGS).

Cette analyse exclue les 7 échantillons sans résultats.

Des résultats concordants ont été obtenus pour 188 échantillons (Figure 22 et Tableau 5 ; cases surlignées en gris). Pour 2 échantillons, une double mutation a été obtenue avec la méthode de référence, ces échantillons ont été considérés comme concordants (Tableau 5 ; cases surlignées en orange). 6 échantillons indiquaient des résultats discordants (Tableau 5 ; cases surlignées en orange). 6 échantillons indiquaient des résultats discordants (Tableau 5 ; cases surlignées en orange). 4 échantillons était exclus de l'analyse de concordance car la méthode de référence indiquait une mutation non ciblée par l'Idylla™ EGFR (Tableau 5 ; cases surlignées en vert et Figure 22).

L'analyse de concordance des résultats du test est présentée dans le Tableau 6. Pour l'analyse de concordance, nous avons exclu les 7 échantillons sans résultats et les 4 échantillons dont la mutation n'est pas ciblée par l'Idylla™ EGFR.

		Méthode NGS		
		Mutation détectée	Aucune mutation détectée	Total
Idylla™™ EGFR	Mutation détectée	19	0	19
	Aucune mutation détectée	2	169	171
	Total	21	169	190

Tableau 6 : Concordance et discordance entre les résultats du statut mutationnel de l'EGFR déterminés par technique Idylla™ et méthode de référence (NGS).

Cette analyse exclue les 7 échantillons sans résultats et les 4 échantillons dont la mutation n'est pas ciblée par l'Idylla™ EGFR.

Le Tableau 7 présente les concordances des résultats de recherche des mutations de l'EGFR par la technique Idylla™ et NGS, en pourcentage. Il en résulte un pourcentage de concordance totale de 98,95% entre l'Idylla™ et le NGS

	Estimation ponctuelle
Concordance totale	98,95%
Concordance positive (Présence d'une mutation de l'EGFR dans l'échantillon analysé)	90,51%
Concordance négative (Absence de mutation de l'EGFR dans l'échantillon analysé)	100%

Tableau 7 : Concordance du résultat de recherche des mutations de l'EGFR par la technique Idylla™ avec celui de la méthode de référence (NGS).

Détails des cas discordants

Six échantillons se sont révélés discordants (Tableau 5 et Figure 22), pour chaque cas les conditions matérielles requises par le fournisseur pour la bonne exécution du test ont été respectées. Pour 4 patients la discordance était due à une mutation de l'EGFR rare non recherchée par la technique Idylla™ (Tableau 8).

Mutations EGFR rares de la cohorte	Valeur prédictive à la réponse aux ITK
Ex18 c.2132A>T ; p.(Glu711Val)	Valeur prédictive indéterminée
Ex19 c.2240_2264delinsCGAAAGA ; p.(Leu747_Ala755delinsSerLysAsp)	Confèrent une sensibilité de l'EGFR aux ITK de 1 ^{ère} et 2 ^{ème} génération.
Ex20 c.2320G>A ; p.(Val774Met)	Valeur prédictive indéterminée
Ex20 c2320G>T ; p.(VAL774Leu)	Valeur prédictive indéterminée

Tableau 8 : Détails des mutations rares présentent au sein de la cohorte non recherchée par Idylla™ et leurs valeurs prédictives à la réponse aux ITK.

Patients avec un résultat faux négatif par Idylla™ :

Patient 1 : Le prélèvement du CFB était une biopsie osseuse d'une métastase d'un adénocarcinome TTF1+ d'une femme de 74 ans, avec une cellularité tumorale évaluée à 40% (plus de 100 cellules analysables). L'analyse par NGS met en évidence une mutation de l'EGFR : variant c.2582T>A, p.(Leu861Gln) dans l'exon 21 avec une

fréquence allélique de 11,10 %. L'analyse Idylla™ ne détecte aucune mutation (Cq contrôle EGFR = 26,8). Le CQ du contrôle de l'EGFR est élevé (supérieur à 26) et aurait dû alerter sur la validité de l'analyse d'autant plus que le prélèvement avait été décalcifié à l'EDTA ce qui endommage l'ADN.

Au cours de l'étude en dehors de ce cas, 4 autres cas avec un CQ contrôle trop élevé (supérieur à 26) ont été validés comme non contributifs. La moyenne des CQ de contrôle en excluant les 4 résultats Idylla™ non contributifs était de 21,7 (SD 2,2). La Figure 23 illustre la répartition des CQ de contrôle de l'EGFR de chaque échantillon validé par la technique Idylla™ et par le biologiste : 58 échantillons (29,6%) présentent un CQ de contrôle de l'EGFR supérieur à 22 (valeur théorique fixée par Biocartis).

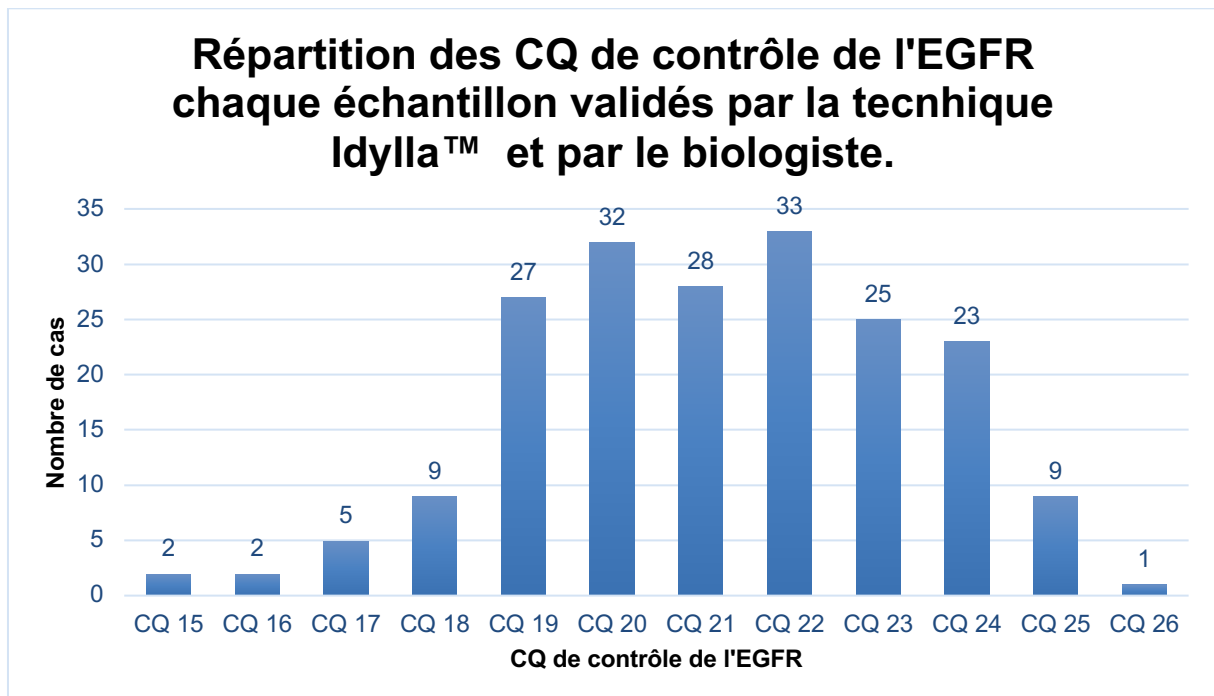


Figure 23 : Répartition des CQ de contrôle de l'EGFR de chaque échantillon validé par la technique Idylla™ et le biologiste.

Patient 2 : Le prélèvement du CFB était une biopsie osseuse d'une métastase d'un carcinome non à petites cellules en faveur d'un adénocarcinome TTF1+ d'une femme de 67,2 ans, avec une cellularité tumorale évaluée à 10% (plus de 100 cellules analysables). L'analyse par NGS met en évidence une mutation EGFR : variant c.2240_2257del, p.(Leu747_Pro753delinsSer) dans l'exon 19 avec une fréquence allélique de 2,80 %. L'analyse Idylla™ ne détecte aucune mutation (Cq contrôle EGFR = 24,1). L'outil Idylla™ Explore (Figure 24) montre la présence d'une courbe d'amplification appelée Del18/21b/24 qui apparaît à partir de 34 cycles. La Del 18

correspond à la mutation c.2240_2257del, p.(Leu747_Pro753delinsSer) dans l'exon 19 mis en évidence et validée par le NGS. L'amplification de cette mutation n'a pas été validée par le système Idylla™ car le ΔCq (différence entre le CQ du contrôle de l'EGFR et le CQ de la mutation détectée) étaient en dehors des critères de validation du système Idylla™. Ici la fréquence allélique de la mutation mis en évidence par le NGS était faible et notre technique Idylla™ pour ce patient n'était pas suffisamment sensible. Après vérification, la lame HES de contrôle (après la réalisation des copeaux) objectivait une cellularité tumorale à 5%, nous pouvons supposer que le prélèvement ne comportait pas suffisamment de cellules tumorales.

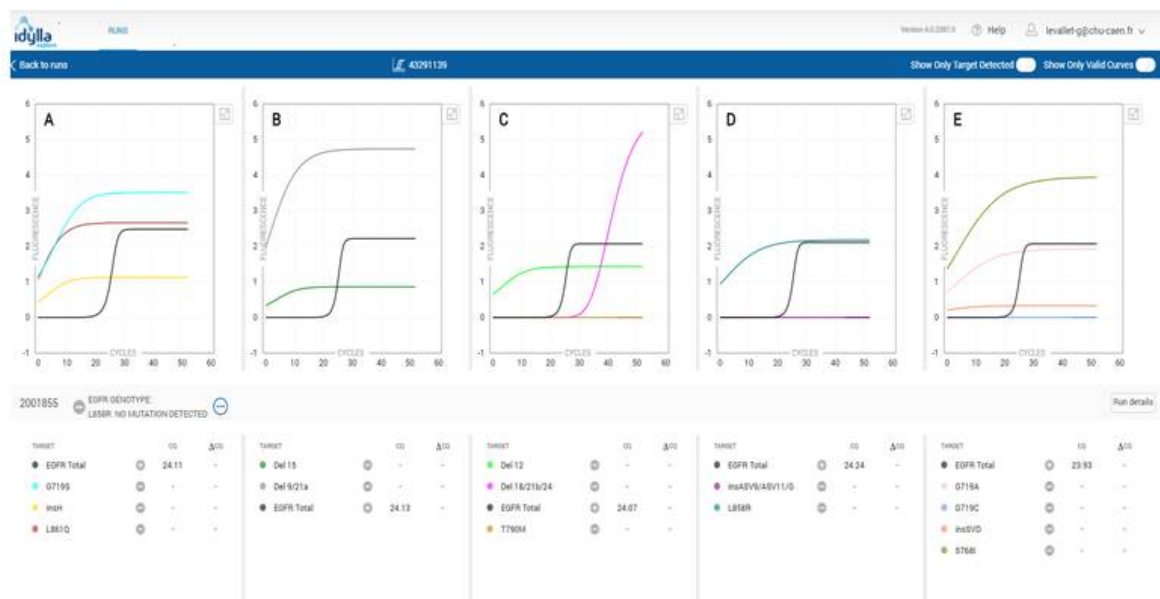


Figure 24 : Courbes d'amplifications détectées, validées et non validées par le système Idylla™ du patient 2.

C : Courbe d'amplification violette nommée Del 18/21b/24 détectée à partir de 34 cycles mais non validée par la technique Idylla™. Del 18 comprend la mutation c.2240_2257del, p.(Leu747_Pro753delinsSer) dans l'exon 19.

Concordance des prélèvements décalcifiés :

Dans notre cohorte nous avons 20 prélèvements décalcifiés (9,2%) par l'EDTA, un chélateur d'ions bivalents. Pour 2 échantillons le résultat Idylla™ n'était pas concordant avec le résultat NGS, soit la concordance globale pour les prélèvements décalcifiés par EDTA était de 90% (18/20).

C- Délai d'analyse Idylla™ versus NGS

Afin de comparer les délais d'analyse (temps entre la date de prélèvement et la date de résultat) des deux techniques, nous avons exclu les 7 prélèvements sans résultat Idylla™ ou NGS. La comparaison a été effectuée avec les 194 échantillons ayant eu un résultat valide avec les deux méthodes.

Le délai d'analyse moyen pour Idylla™ est de 6,6 (3,7 SD) jours ouvrés *versus* 15,8 (4,2 SD) jours ouvrés pour le délai d'analyse moyen par NGS.

Les délais des deux techniques sont significativement différents avec un p-value <0,001 (Tableau 9).

Délai d'analyse de EGFRm	Jours ouvrés				Jours calendaires			
	Moy	Med	SD	Test T	Moy	Med	SD	Test T
Idylla™	6,6	6,0	3,7	p value <0,001	9,3	8,0	5,2	p value < 0,001
NGS	15,8	15,0	4,2		21,8	21,0	5,9	

Tableau 9 : Comparaison des délais d'analyses de EGFRm par technique Idylla™ et NGS.

Moy : moyenne

Med : médiane

SD : écart-type

Les figures 25 et 26 montrent la répartition des délais d'analyses des échantillons.

En jours ouvrés (Figure 25), avec l'analyse par Idylla™, le résultat de 90% des prélèvements était validé et disponible pour le clinicien à 11 jours, tandis qu'avec la technique NGS, il fallait attendre 21 jours pour atteindre ce seuil.

En jours calendaires (Figure 26), avec l'analyse par Idylla™, le résultat de 90% des prélèvements était validé et disponible pour le clinicien à 15 jours, tandis qu'avec la technique NGS, il fallait attendre 29 jours pour atteindre ce seuil.

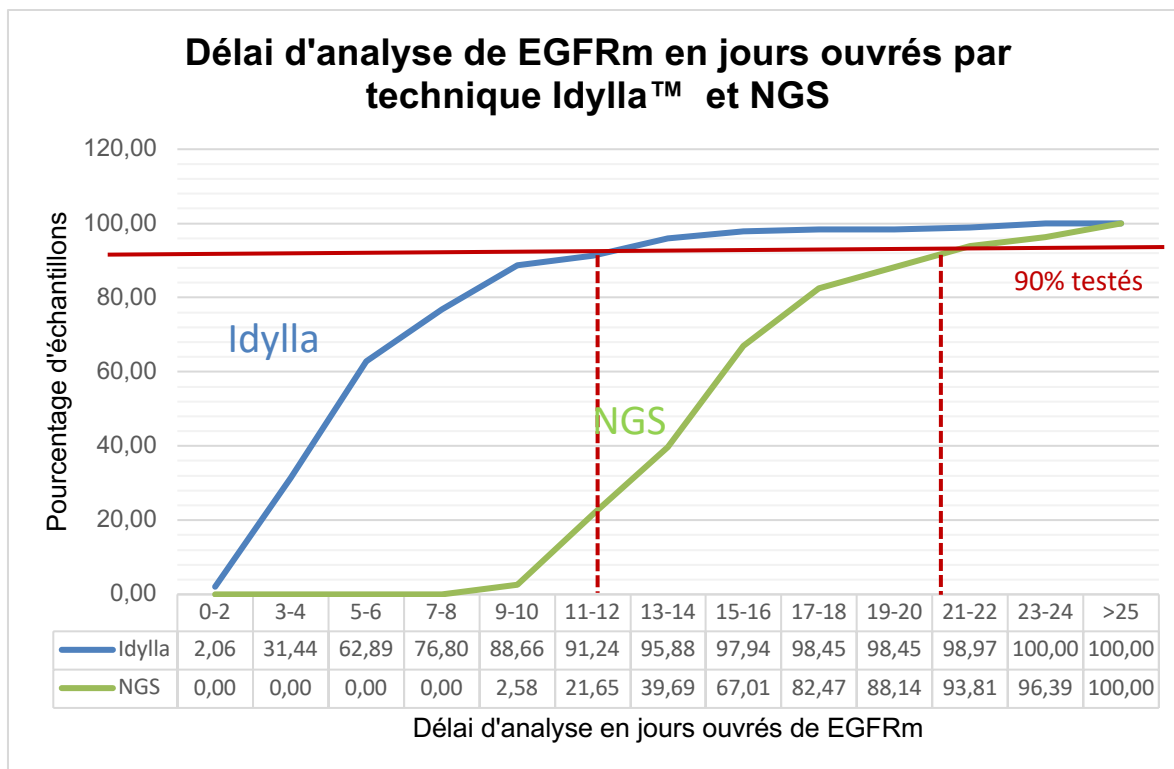


Figure 25 : Délai d'analyse de EGFRm en jours ouvrés par technique Idylla™ et NGS.

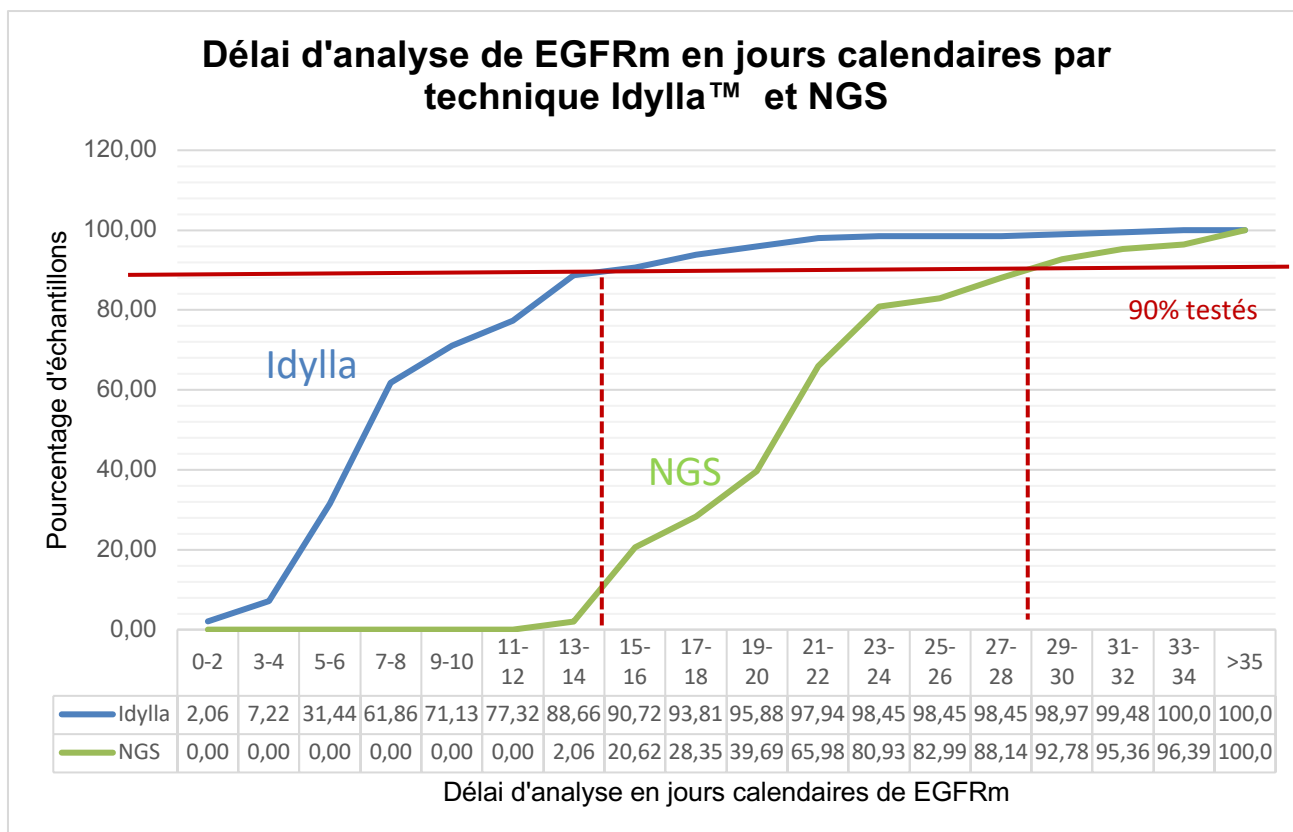


Figure 26 : Délai d'analyse de EGFRm en jours calendaires par technique Idylla™ et NGS.

D- Bénéfice pour le patient

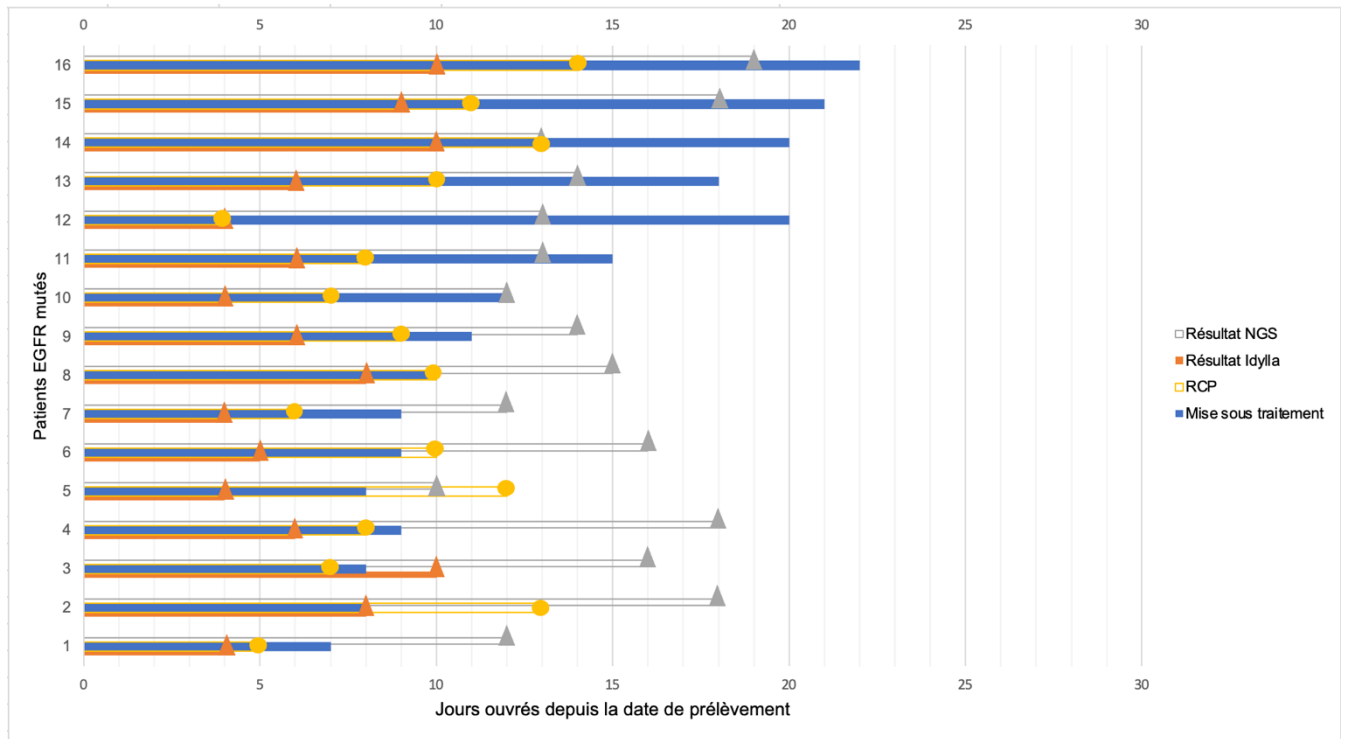


Figure 27 : Délai en jours ouvrés de la mise sous traitement avec les différents délais d'analyse Idylla™, NGS et RCP pour les 16 patients mutés diagnostiqués par la technique Idylla™ et traités par un ITK.

Pour apprécier le bénéfice de l'analyse rapide de la mutation EGFR, nous avons sélectionné les patients mutés diagnostiqués par la technique Idylla™ et traités par un ITK soit 16 patients (détails des patients en annexe 4). Nous avons comparé les délais en jours ouvrés à partir du prélèvement, de la RCP et de la mise sous traitement avec les délais de résultat de l'Idylla™ et du NGS. La Figure 27, met en évidence que pour 10 patients (62,5%) le traitement a été instauré avant le résultat NGS et que pour 15 patients (93,8%) la RCP a été réalisée avant le résultat NGS donc sur la base du résultat donné par la technique Idylla™.

Le délai moyen entre le prélèvement et la mise sous traitement est de 12,9 (5,4 SD) jours ouvrés et le délai moyen entre le résultat Idylla™ et la mise sous traitement est de 6,4 (5,0 SD) jours ouvrés.

E- Consommation des prélèvements tumoraux inclus en paraffine pour le duo d'analyses du statut mutationnel de l'EGFR par Idylla™ et NGS

Au cours de l'étude, pour 24 échantillons (11,9%) (20 échantillons du CHU et 4 échantillons du CFB), la lame HES, après réalisation des copeaux ayant permis la recherche du statut mutationnel de l'EGFR, n'a pas été réalisée par les techniciens en poste probablement en raison d'une disparition du motif au sein du bloc. Pour les 177 autres échantillons, la lame HES de contrôle a bien pu être réalisée : 22 échantillons (8 CHU et 14 du CFB) présentaient une cellularité tumorale inférieure ou égale à 5% (cellularité tumorale insuffisante pour envisager d'autres analyses complémentaires) (Figure 27).

En considérant les 24 données non renseignées comme échantillons épuisés : 46 échantillons (22,9%) étaient ainsi épuisés ou avaient une cellularité tumorale insuffisante pour envisager d'autres analyses complémentaires après la réalisation des copeaux nécessaires à l'analyse par Idylla™ et à l'analyse par NGS ; soit 28 échantillons du CHU et 18 échantillons du CFB.

A noter que le nombre d'échantillons épuisés au CHU après réalisation de la biologie moléculaire est majoré, car au cours de l'étude, la prise en charge du pré-analytique a été modifiée et la réalisation d'une lame HES après copeaux a été supprimée par erreur de la feuille de travail.

La cellularité tumorale présente au sein des prélèvements avant et après réalisation des copeaux est significativement différente avec un p value = $<0,001$ (Tableau 9).

Avant la réalisation des copeaux, la cellularité tumorale des prélèvements du CHU comparée à la cellularité tumorale des prélèvements du CFB ne présente pas de différence significative (p value = 0,55) (Tableau 9).

Après la réalisation des copeaux, la cellularité tumorale des prélèvements du CHU comparée à la cellularité tumorale des prélèvements du CFB présente une différence significative (p value = 0,02) (Tableau 10).

Cellularité tumorale	Moyenne	Ecart-Type	Test T	
Avant BM	42,1	24,7		p value < 0,001
CHU	40,3	25,4	p value = 0,55	
CFB	42,5	24,3		
Après BM	33,8	23,9		
CHU	27,0	23,7	p value = 0,02	
CFB	35,9	23,6		

Tableau 10: Comparaison des cellularités tumorales avant et après réalisation des copeaux pour l'analyse de biologie moléculaire.

BM : biologie moléculaire.

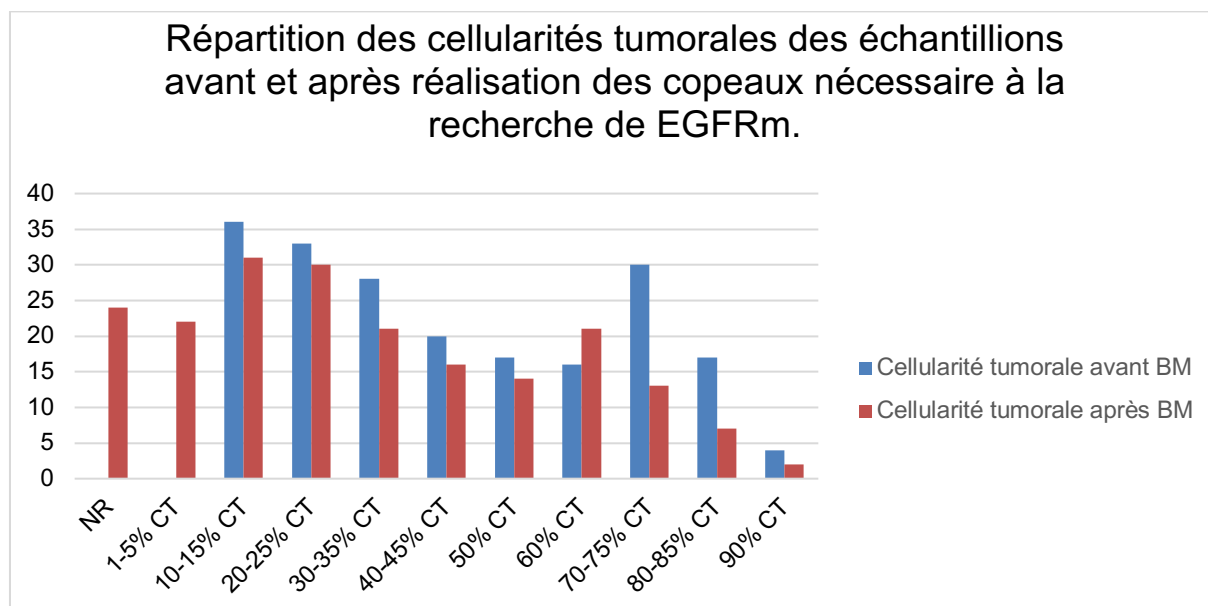


Figure 28 : Répartition des cellularités tumorales des échantillons avant et après réalisation des copeaux nécessaire à la recherche de EGFRm.

BM : biologie moléculaire

CT : cellules tumorales

NR : non renseignée

F- Délai d'analyse de l'expression de PD-L1 et de la recherche de fusion ALK et ROS1.

En moyenne le délai d'analyse (temps entre la date de prélèvement et la date de résultat) est de 14,4 (14,1 SD) jours ouvrés.

Au CHU, le délai d'analyse est en moyenne de 10,5 (6,8 SD) jours ouvrés.

Au CFB, entre le 1^{er} janvier 2019 et le 15 janvier 2020, quand la technique et l'interprétation de ROS1 était réalisée par le service d'ACP du CHU, le délai d'analyse est de 21,9 (17,5 SD) jours ouvrés. Du 16 janvier jusqu'à la fin de l'étude, quand toutes

les techniques sont réalisées et interprétées par le CFB, le délai d'analyse est de 6,4 (5,4 SD) jours ouvrés. Ces délais avant le 16 janvier 2020 et après le 16 janvier 2020 sont significativement différents avec un p value = <0,001 (Tableau 11).

Délai d'analyse PD-L1 ROS et ALK	Jours ouvrés				Jours calendaires			
	Moy	Med	SD	Test T	Moy	Med	SD	Test T
Total	14,4	12,0	14,1		20,4	17,0	19,8	
CHU	10,5	9,0	6,8		14,9	13,0	9,5	
CFB	16,1	14,0	16,1		23,0	20,0	9,5	
1/01/19 – 15/01/20	21,9	18,0	17,5	p value < 0,001	30,3	25,0	24,6	p value < 0,001
16/01/20 – 31/08/20	6,4	5,0	5,4		9,6	7,0	7,9	

Tableau 11 : Comparaison des délais d'analyses de PD-L1, ROS et ALK.

Moy : moyenne

Med : médiane

SD : écart-type

Quand on compare les délais d'analyses des 201 patients entre l'Idylla™ EGFR, le NGS et les statuts PD-L1, *ROS1* et *ALK* : le délai d'analyse d'Idylla™ EGFR est toujours plus rapide et 31,3% des résultats PD-L1, *ROS1* et *ALK* sont validés après le résultat NGS (Figure 29).

Délai d'analyse en jours ouvrés des statuts PD-L1, ROS1 et ALK et de EGFRm par technique Idylla™ et NGS

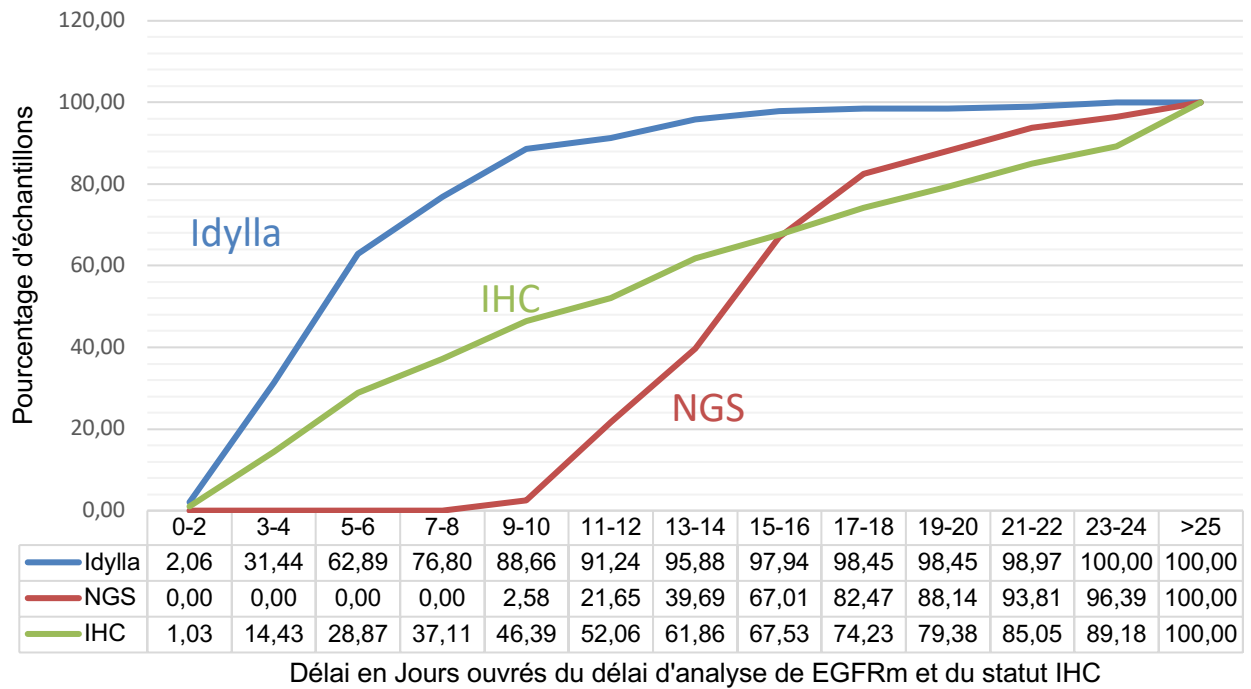


Figure 29 : Délai d'analyse en jours ouvrés des statuts PD-L1, ROS1 et ALK et de EGFRm par technique Idylla™ et NGS.

IHC : l'ensemble des statuts PD-L1, ALK et ROS1 validés par le pathologiste.

IV- Discussion

Dans les CBPNPC non épidermoïdes au stade avancé, la première ligne de traitement ne doit se décider qu'avec la connaissance des mutations drivers (*ROS1*, *ALK* et *EGFR*) et du statut PD-L1. Devant une maladie évoluant rapidement, l'enjeu actuel des laboratoires est de répondre à la demande de manière sensible et spécifique dans des délais compatibles avec la prise en charge du patient.

Le but de l'étude prospective ID-MUT était de mettre en place et d'évaluer une analyse rapide ciblée de la mutation *EGFR* par technique Idylla™ et de la comparer à la technique par séquençage nouvelle génération (NGS) ion Torrent sur une cohorte de 225 patients suivis au CHU et au Centre de Lutte Contre le Cancer de Caen.

La mise en place de la technique Idylla™ au sein du service d'Anatomie et Cytologie pathologique du CHU de Caen a été simple, et présente peu de contrainte concernant son emplacement avec un temps technicien réduit. Concernant la calibration de la quantité de matériel utilisée, afin d'augmenter notre sensibilité sur les échantillons présentant un pourcentage de VAF faible, nous utilisons une quantité de matériel FFPE supérieure à celle préconisée par le fournisseur (3 coupes à 20 µm VS 1 coupe à 10 µm). Nous utilisons la même quantité de matériel FFPE que pour la technique NGS ce qui facilite la réalisation des copeaux par les techniciennes mais qui épuise davantage le bloc. Dans notre étude, nous avons estimé qu'au maximum 22,9% des échantillons n'étaient plus exploitables après l'étude de biologie moléculaire par NGS et Idylla™. Depuis 2017, plusieurs études rétrospectives et depuis 2020 des études prospectives qui comparent la technique Idylla™ *EGFR* vs le NGS (ou d'autres méthodes de routine) et qui suivent les recommandations du fournisseur, c'est-à-dire 1 copeau à 10 µm, concluent tous à une bonne sensibilité de la technique Idylla™. Notamment l'étude d'Evrard et al. rétrospective et multicentrique incluant 15 centres, qui évalue la technique Idylla™ *EGFR* sur 449 blocs archivés utilisant 1 coupe à 10 µm conclut à une concordance de 97,6% (27). Dans notre étude nous avons une excellente concordance calculée à 98,9% en utilisant davantage de matériel. Au cours de l'étude, en évaluant la concordance des résultats *EGFRm* Idylla™ et NGS, nous avons pu ajuster nos critères de validation de la technique Idylla™ *EGFRm*, notamment en augmentant le seuil des CQ du contrôle de l'*EGFR* à 26.

La technique NGS en parallèle est indispensable pour la 2^{ème} ligne de traitement concernant le statut mutationnel exhaustif des mutations de BRAF V600E, mutation de MET dans l'exon 14, mutation de KRAS G12C et pour la mutation de résistance à l'Osimertinib (ITK de 3^{ème} génération) C797S (21,22). Elle reste indispensable pour les faux négatifs en Idylla™ *EGFR* et pour certaines mutations rares de l'*EGFR* non analysées par la technique Idylla™. Dans notre étude, le résultat NGS a permis de rendre éligible 3 patients à une ITK de 1^{ère} et 2^{ème} génération : 2 faux négatifs en Idylla™ et une mutation rare de l'*EGFR* non analysée par Idylla™ sensible au ITK de 1^{ère} et 2^{ème} génération. Actuellement, des essais thérapeutiques sont en cours pour certaines mutations rares de l'*EGFR* (insertion de l'exon 20 et mutations dans l'exon 18 et 21), et pour la mutation *BRAF* V600E, le saut d'exon 14 de *MET*, la mutation *KRAS* G12C et les mutations de *HER2*. Ces mutations sont toutes recherchées lors de l'analyse par NGS. Des essais thérapeutiques sont aussi en cours concernant les amplifications dans le gène *MET* et les translocations des gènes *RET* et *NTRK1-3* (22).

Le NGS permet de suspecter une amplification du gène *MET* (en décelant un gain de copie) et de le signaler au clinicien et au pathologiste afin de confirmer cette amplification par hybridation *in situ*. L'analyse des fusions des gènes *RET* et *NTRK1-3* doivent se faire par hybridation *in situ* ou par séquençage de l'ARNm. Le NGS sur ADN n'est pas adapté pour ces altérations génomiques et complexifie la bio-informatique. A Caen, la structure fédérative MOCAE (SF-MOCAE) travaille sur la mise en place du séquençage de l'ARN par NGS afin de rechercher ces fusions (technologie ARCHER). Cette technique nécessite l'extraction préalable de l'ARN sans consommation supplémentaire de matériel grâce à une co-extraction ADN/ARN.

La gestion du matériel dans le diagnostic et le théranostic des CBPNPC est indispensable. Il est ainsi recommandé de prédéfinir des algorithmes des séquences techniques afin de regrouper les demandes pour économiser le bloc FFPE (3–5). En effet, à chaque nouvelle demande complémentaire sans rubans ni lames blanches disponibles, les techniciennes ont tendance à dégrossir le bloc FFPE malgré les ajustements du microtome réalisés manuellement. La technique de ruban utilisée au CFB semble performante avec de meilleurs résultats que le CHU concernant la disponibilité du matériel après la réalisation des copeaux (28 échantillons épuisés au CHU vs 18 échantillons au CFB). La technique des rubans implique d'avoir la place

nécessaire pour le stockage des rubans. Certains grands centres, comme l'Hôpital BICHAT – APHP, utilisent les rubans uniquement pour les petits prélèvements notamment pour les biopsies bronchiques et pulmonaires.

Afin de rentabiliser au maximum le matériel, des équipes réalisent la technique Idylla™ directement à partir de l'ADN préalablement extrait avec des résultats de sensibilité similaire. L'équipe de De Luca et al., rapporte d'excellents résultats à partir de 10 ng d'ADN, notamment sur des échantillons invalides en NGS et conclue que « dans les cas invalides en NGS, le système Idylla™ est une option viable et rapide pour le test *EGFR* » (28). Au moment de notre étude, l'extraction d'ADN était réalisée par Genecan sur le site de Clémenceau et n'était pas réalisée tous les jours. Ainsi à Caen, l'utilisation d'ADN extrait n'était pas envisageable au risque d'augmenter les délais de rendus de résultats de la technique Idylla™. Depuis la création de la SF-MOCAE, qui regroupe la biologie moléculaire des tumeurs solides et hémopathies malignes sur un même site, l'utilisation de l'ADN extrait est en cours d'évaluation afin de préserver au maximum les échantillons tumoraux des patients.

Concernant nos deux échantillons faux négatifs lors de l'analyse du statut mutationnel de l'*EGFR* par la méthode Idylla™, ils provenaient de biopsies osseuses décalcifiées par l'EDTA. La décalcification à l'EDTA a comme propriété de ramollir les tissus osseux. Il chélate le calcium qui rigidifie l'os, tout en préservant au maximum l'ADN. Au sein de notre cohorte nous avons 20 prélèvements (10%) décalcifiés dont 5 mutés avec une moyenne de CQ contrôle de l'*EGFR* à 21,9. Seuls 2 prélèvements n'étaient pas concordants, le premier avec un CQ contrôle de l'*EGFR* supérieur à 26 et le second avec une quantité de cellules tumorales faibles. L'équipe de Boureille et al. s'est intéressée à la performance de la technique Idylla™ *EGFR* dans les biopsies osseuses décalcifiées par EDTA ou par acide formique à 5%. Sur leurs 34 échantillons, 33 ont été validés par la technique Idylla™ contre 29 par NGS ou Sanger. La concordance globale était de 89,7% contre 90% dans notre cohorte. Dans leur cohorte, il existait également des échantillons faux négatifs avec un CQ du contrôle de l'*EGFR* supérieur à 26 qui étaient validés par la technique Idylla™ (29). L'équipe de Momeni-Boroujeni a mis au point un pipeline pour la validation d'Idylla™ *EGFR* à partir de l'analyse détaillée systématique des courbes via Idylla™ explore et de l'interprétation du CQ en fonction de la cellularité tumorale présente dans l'échantillon. Dans leur étude, ce pipeline a amélioré la concordance de la technique Idylla™ de 98,5% à 99,4% (30). Cette dernière étude et notre expérience souligne, que la

technique Idylla™ est un automate simple d'utilisation et sensible. Néanmoins la validation du système doit être contrôlée par un pathologiste ou un biologiste. Nous préconisons de ne pas hésiter à émettre des réserves si le prélèvement n'est pas adéquat ou si le CQ du contrôle de l'*EGFR* est supérieur à 26.

A Caen, la mise en place de la technique Idylla™ a été motivée par les cliniciens, qui souhaitent accélérer la prise en charge de leurs patients. Pour les patients atteints d'un CBPNPC métastatique porteur de mutations de l'*EGFR*, le développement des ITK de l'*EGFR* a permis une amélioration importante dans la prise en charge thérapeutique, comme le montre l'augmentation de la survie sans progression et la limitation des toxicités à l'aide des ITK de l'*EGFR* pour les patients avec un CBPNPC muté par *EGFR* par rapport à la chimiothérapie (31). Cependant, un long délai pour initier les ITK *EGFR* peut entraîner une progression rapide de la maladie et une détérioration de l'état du patient associée à un pronostic plus défavorable (32). Il en est de même pour l'initiation de l'immunothérapie ou d'une chimiothérapie. Ainsi, il est essentiel d'accélérer la disponibilité des résultats des sous-types moléculaires. Les directives ASCO/CAP/IASLC/AMP recommandent un délai d'attente de 10 jours ouvrables entre la réception de l'échantillon et la communication des résultats des tests moléculaires (7). Dans notre étude, la technique Idylla™ répond à cette recommandation avec un délai d'analyse moyen de 6,6 jours ouvrés contrairement à l'analyse par NGS qui a un délai moyen de 15,8 jours ouvrés de rendu de résultat (p value <0,001). Les résultats du statut PD-L1 et des mutations drivers *ROS1* et *ALK*, quand *EGFR* est non muté sont également indispensables pour l'initiation du traitement. Dans notre cohorte, la moyenne du délai d'analyse et de validation complète du statut PD-L1, *ROS1* et *ALK* à partir de la date du prélèvement est en moyenne de 14,6 jours ouvrés. Ce délai supérieur aux recommandations est diminué quand l'ensemble des statuts sont techniqués et analysés directement par le centre d'origine sans externalisation : en moyenne calculé à 10,5 jours ouvrés au CHU de Caen et à 6,6 jours ouvrés au CFB (p value < 0,001). Ces résultats soulignent qu'il est important d'optimiser l'organisation du travail, de continuer à sensibiliser les pathologistes pour répondre rapidement les marqueurs théranostiques et de sensibiliser les centres et cabinets privés à acquérir les anticorps PDL1, *ROS1* et *ALK* pour ne pas devoir sous-traiter ces analyses. Concernant le bénéfice de l'analyse rapide par Idylla™, 10 patients (62,5%) sur les 16 patients mutés *EGFR* par Idylla™

et traités par TKI ont été mis sous traitement (avant connaissance du résultat NGS) et 15 patients (93,8%) ont été présentés en RCP avant que le résultat NGS soit disponible. Dans notre cohorte, les délais pour chaque patient muté varient beaucoup, notamment selon les souhaits des patients et les inclusions dans les essais thérapeutiques qui sont des facteurs difficiles à optimiser. Il serait judicieux d'augmenter la cohorte pour évaluer le bénéfice du patient afin d'évaluer la survie sans progression, l'impact psychologique et économique d'une mise sous traitement plus rapide. Le délai technique reste un facteur facile à évaluer et à optimiser avec des recommandations établies contrairement au délai de la mise sous traitement.

En routine, pour minimiser le temps d'analyse Kerr et al recommandent d'effectuer les tests moléculaires dans le même centre où le patient a été diagnostiqué histologiquement pour limiter les intermédiaires et les désarchivages de bloc (4). L'automate Idylla™ qui extrait l'ADN et analyse les mutations *EGFR* à partir de copeaux FFPE avec une installation et un temps technique court, permet aux laboratoires privés d'accéder à la recherche de mutation et d'accélérer la prise en charge des patients traités en ville et au total de favoriser l'égalité des soins. Ainsi l'extraction et l'analyse 2 en 1 de l'automate Idylla™ est sensible et simple de mise en place pour les laboratoires de ville, contrairement à d'autres automates qui proposent également une analyse rapide en PCR temps réel, mais à partir d'ADN déjà extrait. Par exemple, l'automate Easy PGX™ est capable d'analyser en 96 minutes, plusieurs échantillons et différentes mutations dans un même run. Pour un CHU ou un laboratoire qui a facilement accès à l'extraction d'ADN, Easy PGX™ peut être une bonne alternative que le système Idylla™ en conservant une rapidité de réponse par rapport au NGS.

Dans un futur proche, la prise en charge des CBPNPC *EGFR* mutés va connaître une évolution majeure avec le développement de la médecine de précision dans le traitement des stades localisés. En effet, l'étude randomisée de phase III ADAURA a comparé dans les CBPNPC mutés *EGFR* de stade IB à IIIA, après résection complète, un traitement adjuvant par Osimertinib (ITK de 3^{ème} génération) pendant 3 ans à un placebo. L'étude a montré une efficacité sur la survie sans maladie chez les patients de stades II ou IIIA (33). Le développement des thérapies ciblées en situation adjuvante posera des questions d'organisation et de coût. La technique Idylla™ paraît idéale sur les pièces opératoires car la quantité de matériel disponible est importante. Après discussion/concertation entre pathologistes, biologistes moléculaires et

cliniciens, la SF-MOCAE analyse les pièces opératoires *via* la technique Idylla™ afin de ne pas emboliser l'extraction d'ADN.

La place de l'ADN tumoral circulant dans le suivi des patients atteints d'un CBPNPC sera probablement aussi amenée à évoluer grâce aux avancées techniques. Actuellement les indications concernent principalement l'établissement du profil moléculaire au diagnostic ou à la progression en cas d'épuisement ou d'inaccessibilité du matériel tissulaire (4).

Aujourd'hui les tests NGS avec des biopsies liquides et tissulaires peuvent être considérés comme complémentaires, la biopsie liquide donnant des résultats plus rapides mais la biopsie tissulaire ayant un taux de faux négatifs plus faible (4).

A Caen, la recherche des mutations *EGFR* et surtout de la mutation de résistance T790M sur ADN tumoral circulant par NGS dans le suivi des patients est accessible facilement. La société Biocartis commercialise pour l'instant uniquement à visée de recherche, avec un passage sous peu de la certification, des cartouches ct*EGFR* pour rechercher les mutations *EGFR* à partir du plasma sur l'automate Idylla™. L'intérêt de la technique Idylla™ sur plasma, comparé au NGS, est lié à un délai technique plus rapide, un temps technicien et biologiste réduit et un coût plus faible.

V- Conclusion

Cette étude permet de confirmer la bonne sensibilité de la technique Idylla™ et sa rapidité, permettant de respecter un délai d'analyse inférieur à 10 jours ouvrés pour répondre aux directives ASCO/CAP/IASLC/AMP et pour favoriser l'accès à une médecine de précision rapide et bénéfique pour les patients. Cette étude sur une cohorte prospective de 225 patients nous a permis de valider l'utilisation en routine de la technique Idylla™ : il est maintenant acté qu'au CHU de Caen et qu'au CFB, tous les patients atteints d'un CBPNPC bénéficient d'un génotypage de l'*EGFR* par Idylla™ et par NGS. Cette étude est soumise sous forme d'article dans le journal Current Oncology (Annexe 5).

Pour une égalité d'accès aux soins, la technique Idylla™ est facilement accessible pour les laboratoires de ville. Cependant même si la console Idylla™ est autonome, il est important de calibrer le matériel à utiliser pour assurer une bonne sensibilité de la technique, de savoir interpréter les courbes d'amplifications et de remettre en cause les résultats validés automatiquement par la console Idylla™. La gestion du matériel est également importante car l'analyse détaillée du profil mutationnel par NGS est indispensable et la technique Idylla™ consomme beaucoup de matériel. Pour les centres équipés, l'alternative à partir d'ADN préalablement extraite est judicieuse.

Le pathologiste a un rôle à jouer dans l'optimisation du matériel et des délais, en utilisant des algorithmes pour le diagnostic des CBPNPC et en prescrivant de manière réflexe et rapide les tests moléculaires. La réalisation des tests théranostiques au sein du même centre est à favoriser pour accélérer le délai d'analyse en limitant les intermédiaires et les désarchivages de bloc.

Perspectives

Pour continuer d'améliorer la prise en charge théranostique des patients atteints d'un CBPNPC, la plateforme SF-MOCAE met au point en routine : (i) la technique Idylla™ *EGFR* à partir d'ADN préalablement extrait afin d'optimiser le matériel et (ii) la technologie ARCHER sur NGS à partir de l'ARN extrait afin d'accélérer et fluidifier les recherches et la confirmation des fusions *ROS1*, *ALK*, *RET*, et *NTRK 1-3*.

Concernant le bénéfice pour les patients, mutés *EGFR* et non-mutés *EGFR*, une seconde étude serait à envisager pour évaluer le coût économique de l'implémentation de la technique Idylla™ dans la prise en charge globale des patients atteints d'un CBPNPC. On peut émettre l'hypothèse qu'une médecine de précision précoce et adaptée à chaque patient réduirait les frais de prise de charge hospitalier avec une amélioration de la qualité de vie des patients.

Bibliographie

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* mai 2021;71(3):209-49.
2. Travis WD, Weltgesundheitsorganisation, International Agency for Research on Cancer, éditeurs. WHO classification of tumours of lung, pleura, thymus and heart. 4. ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2015. 412 p. (World Health Organization Classification of tumours).
3. Dietel M, Bubendorf L, Dingemans A-MC, Doooms C, Elmberger G, García RC, et al. Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): recommendations of the European Expert Group. *Thorax.* 2016;71(2):177-84.
4. Kerr KM, Bibeau F, Thunnissen E, Botling J, Ryška A, Wolf J, et al. The evolving landscape of biomarker testing for non-small cell lung cancer in Europe. *Lung Cancer.* 2021;154:161-75.
5. Couraud PS. Référentiels Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique. 2021.
6. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology.* 2018;29(Supplement_4):iv192-237.
7. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142:26.
8. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature.* janv 2018;553(7689):446-54.
9. Gibault L, Cazes A, Narjoz C, Blons H. Biologie moléculaire et prise en charge des patients atteints d'adénocarcinomes du poumon. *Revue de Pneumologie Clinique.* févr 2014;70(1-2):47-62.
10. Deshayes S. ETUDE D-CBP : Evaluation des délais de prise en charge diagnostique et thérapeutique du cancer broncho-pulmonaire : étude prospective au sein du service de pneumologie et d'oncologie thoracique du CHU de Caen. Université de Caen NORMANDIE; 2018.
11. Defossez G, Le Guyader-Peyrou S, Ubry Z, Grosclaude P, Colonna M, Dantony E, et al. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Etude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Synthèse. [Internet]. 2019. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/>

12. Burns DM, Anderson CM, Gray N. Do changes in cigarette design influence the rise in adenocarcinoma of the lung? *Cancer Causes Control*. 2011;22(1):13-22.
13. Khuder SA. Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer*. mars 2001;31(2-3):139-48.
14. Swanton C, Govindan R. Clinical Implications of Genomic Discoveries in Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016;374(19):1864-73.
15. ECN ITEM #309 – Tumeurs du Poumon Primitives et Secondaires [Internet]. Edition 2021 du Référentiel du Collège des Enseignements de Pneumologie pour la préparation des ECN. Disponible sur: <http://cep.splf.fr/>
16. Kim JH, Kim HS, Kim BJ, Han B, Choi DR, Kwon JH. Prognostic Impact of TTF-1 Expression in Non-Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis. *J Cancer*. 2018;9(22):4279-86.
17. Bishop JA, Teruya-Feldstein J, Westra WH, Pelosi G, Travis WD, Rekhtman N. p40 (Δ Np63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Mod Pathol*. mars 2012;25(3):405-15.
18. da Cunha Santos G, Shepherd FA, Tsao MS. EGFR Mutations and Lung Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2011;6(1):49-69.
19. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(3):169-81.
20. Soria J-C, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH, et al. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018;378(2):113-25.
21. Wang S, Tsui ST, Liu C, Song Y, Liu D. EGFR C797S mutation mediates resistance to third-generation inhibitors in T790M-positive non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol*. 2016;9(1):59.
22. OncoBFC, NEON, ONCORIF. Référence Cancer Bronchique Non A Petites Cellules [Internet]. ONCOLOGIK. 2021. Disponible sur: <http://oncologik.fr/referentiels/rrc/cancer-bronchique-non-a-petites-cellules>
23. Sousa A, Silveira C, Janeiro A, Malveiro S, Oliveira A, Felizardo M, et al. Detection of rare and novel EGFR mutations in NSCLC patients: Implications for treatment-decision. *Lung Cancer*. 2020;139:35-40.
24. Tan LY, Walker SM, Lonergan T, Lima NE, Todd AV, Mokany E. Superior Multiplexing Capacity of PlexPrimers Enables Sensitive and Specific Detection of SNPs and Clustered Mutations in qPCR. *PLoS One*. 2017;12(1).
25. Nv B, de Wittelaan G. Idylla™ EGFR Mutation Test. 2017.

26. Delgado-García M, Weynand B, Gómez-Izquierdo L, Hernández MJ, Blanco ÁM, Varela M, et al. Clinical performance evaluation of the Idylla™ EGFR Mutation Test on formalin-fixed paraffin-embedded tissue of non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*. 2020;20(1):275.
27. Evrard SM, Taranchon-Clermont E, Rouquette I, Murray S, Dintner S, Nam-Apostolopoulos Y-C, et al. Multicenter Evaluation of the Fully Automated PCR-Based Idylla EGFR Mutation Assay on Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue of Human Lung Cancer. *J Mol Diagn*. 2019;21(6):1010-24.
28. De Luca C, Rappa AG, Gragnano G, Malapelle U, Troncone G, Barberis M. Idylla assay and next generation sequencing: an integrated EGFR mutational testing algorithm. *Journal of Clinical Pathology*. 2018;71(8):745-50.
29. Boureille A, Ferraro-Peyret C, Pontarollo G, Confavreux C, Pialat J-B, Isaac S, et al. Rapid detection of EGFR mutations in decalcified lung cancer bone metastasis. *J Bone Oncol*. 2020;21:100277.
30. Momeni-Boroujeni A, Salazar P, Zheng T, Mensah N, Rijo I, Dogan S, et al. Rapid EGFR Mutation Detection Using the Idylla Platform. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2021;23(3):310-22.
31. Recondo G, Facchinetti F, Olausson KA, Besse B, Friboulet L. Making the first move in EGFR-driven or ALK-driven NSCLC: first-generation or next-generation TKI? *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(11):694-708.
32. Blanc-Durand F, Florescu M, Tehfe M, Routy B, Alameddine R, Tran-Thanh D, et al. Improvement of EGFR Testing over the Last Decade and Impact of Delaying TKI Initiation. *Curr Oncol*. 2021;28(2):1045-55.
33. Wu Y-L, Tsuboi M, He J, John T, Grohe C, Majem M, et al. Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(18):1711-23.

Annexes


Annexe 1 : Classification OMS 2015 des adénocarcinomes broncho-pulmonaires organisée suivant le degré d'invasion et l'architecture prédominante de la prolifération cellulaire néoplasique.

Classification OMS 2015. <i>WHO 2015 classification.</i>
Classification OMS 2015 des adénocarcinomes
Adénocarcinome
Lésions pré-invasives
Hyperplasie adénomateuse atypique
Adénocarcinome in situ
Adénocarcinome avec invasion minime
Adénocarcinome invasif
Lépidique
Acinaire
Papillaire
Solide
Micropapillaire
Variantes
Adénocarcinome invasif mucineux
Adénocarcinome colloïde
Adénocarcinome fœtal
Adénocarcinome entérique

Annexe 2 : Nomenclature des mutations détectées par l'Idylla™ EGFR Mutation Test.

Exon	Mutation	Fréquence
18	c.2156G>C, p.G719A	0.6%
	G719C mutation:	0.3%
	<ul style="list-style-type: none"> • c.2155G>T, p.G719C • c.2154_2155delinsTT, p.G719C 	
	c.2155G>A, p.G719S	0.5%
19	Exon 19 deletion:	48 %
	• c.2238_2248delinsGC, Del9	
	• c.2239_2248delinsC, Del9	
	• c.2240_2248del, Del9	
	• c.2239_2247del, Del9	
	• c.2239_2251delinsC, Del12	
	• c.2240_2251del, Del12	
	• c.2235_2249del, Del15	
	• c.2236_2250del, Del15	
	• c.2239_2253del, Del15	
	• c.2240_2254del, Del15	
	• c.2238_2252del, Del15	
	• c.2237_2251del, Del15	
	• c.2235_2252delinsAAT, Del15	
	• c.2237_2252delinsT, Del15	
	• c.2234_2248del, Del15	
	• c.2236_2253delinsCTA, Del15	
	• c.2237_2253delinsTA, Del15	
	• c.2235_2251delinsAG, Del15	
	• c.2236_2253delinsCAA, Del15	
	• c.2230_2249delinsGTCAA, Del15	
	• c.2240_2257del, Del18	
	• c.2237_2255delins, Del18	
	• c.2239_2256del, Del18	
	• c.2236_2253del, Del18	
	• c.2239_2258delinsCA, Del18	
	• c.2237_2254del, Del18	
	• c.2238_2255del, Del18	
	• c.2237_2257delinsTCT, Del18	
	• c.2236_2255delinsAT, Del18	
	• c.2236_2256delinsATC, Del18	
	• c.2237_2256delinsTT, Del18	
	• c.2237_2256delinsTC, Del18	
• c.2235_2255delinsGGT, Del18		
• c.2238_2258del, Del21		
• c.2236_2256del, Del21		
• c.2253_2276del, Del24		
20	c.2369C>T, p.T790M	<5%
	c.2303G>T, p.S768I	1.5 to 3%
	Exon 20 insertion:	4 to 9.2 %
	• c.2310_2311insGGT, InsG	
	• c.2307_2308insGCCAGCGTG, InsASV9	
	• c.2309_2310delinsCCAGCGTGGAT, InsASV11	
• c.2311_2312insGCGTGGACA, InsSVD		
• c.2319_2320insCAC, InsH		
21	L858R mutation:	43 %
	• c.2573T>G, p.L858R	
	• c.2573_2574delinsGT, p.L858R	
	• c.2573_2574delinsGA, p.L858R	
	c.2582T>A, p.L861Q	2 %

Annexe 3 : Fiche technique Idylla™ mutation EGFR.

	FICHE TECHNIQUE	PB-ANAPATH
	IDYLLA MUTATION EGFR	Version 1 Du 14/11/2018 Révision le
Entité émettrice : PB-Anapath		page 1/2

I – PRINCIPE

L'Idylla™ EGFR Mutation, instrument qui couvre l'ensemble du processus, de l'échantillon au résultat, avec la préparation de l'échantillon totalement intégrée suivie de l'amplification PCR en temps réel et la détection des séquences ciblées.

Le test détecte les mutations sur l'exon 18 (G719A/C/S), l'exon 20 (T790M, S768I), l'exon 21 (L858R, L861Q), les suppressions sur l'exon 19 et les insertions sur l'exon 20 du gène *EGFR*.

Les Cartouches du Test EGFR sont prêtes à l'emploi et contiennent les réactifs nécessaires pour effectuer la préparation des échantillons et la détection et l'amplification PCR en temps réel, à partir de l'insertion de coupes de tissus FFPE.

II – MATERIEL REQUIS :

- Instrument Idylla
- Console Idylla
- Cartouches Idylla™ EGFR Mutation Test
- Filtres papier Whatman
- Lames de verre
- Eau sans nucléase
- Pince à épiler de préférence non nervurée
- Solution nettoyante

III – MODE OPERATOIRE

1. Préparation d'un échantillon dans le cadre du protocole ID-MUT :

Coupes FFPE :

- Réalisation d'une lame HES
- Réalisation de 4 copeaux de blocs de paraffine à 15 µm : sur un microtome lavé à l'alcool 70% avec une lame neuve.
- Réalisation de 4 copeaux de blocs de paraffine à 15 µm sur un microtome lavé à l'alcool 70% avec une lame neuve pour l'analyse NGS : les stocker dans un tube de 2mL.
- Réalisation d'une lame HES.

-> Stockage et transport au sein d'un tube : les coupes tissulaires FFPE de 20 µm peuvent être conservées entre 15 et 30 °C pendant 60 jours maximum.

1. Prendre une lame en verre, y déposer 2 filtres les humidifier d'eau PCR à l'aide d'une pipette, y déposer environ 20 µl.
2. Avec la pince, placez une ou plusieurs coupes de FFPE sur un des filtres papier humidifiés.
3. Avec la pince, placez le second filtre papier humidifié sur les coupes FFPE.

Utilisez la Cartouche dans les 5 jours qui suivent l'ouverture de la pochette.

Utilisez la Cartouche dans les 8 heures qui suivent l'ouverture de la pochette et le chargement de l'échantillon.

2. Réalisation du test :

Allumer la console et l'instrument :


1. Allumez la console (bouton coté haut à droite)
2. Allumez l'instrument (bouton 0/1 derrière)

Préparation de la cartouche :

1. Vérification de la cartouche : mutation EGFR et date de validité.
2. Ouvrez de la pochette de la cartouche et sortez la cartouche.
3. Identification de la cartouche par le n°Diamic (rectangle en bas à gauche)

Incorporation de l'échantillon dans la cartouche :

1. Tenez la Cartouche par le corps et tirez sur le couvercle pour l'ouvrir.

	FICHE TECHNIQUE	PB-ANAPATH
	IDYLLA MUTATION EGFR	Version 1 Du 14/11/2018 Révision le page 2/2
Entité émettrice : PB-Anapath		

- Avec la pince (à bout rond), prenez l'échantillon préparé avec les filtres papier, et transférez-le dans l'ouverture de la Cartouche. Placez-le soigneusement sur le tampon de lyse situé au fond.

ATTENTION

Vérifiez que l'échantillon est placé au milieu du tampon de lyse afin de garantir le fonctionnement correct du Test. Assurez-vous de ne pas toucher le tampon de lyse avec la pince à épiler ou vos doigts.

- Retirez la fixation et fermez la Cartouche en poussant fermement le couvercle afin de garantir une bonne étanchéité. Tirez légèrement le couvercle pour vérifier qu'il est verrouillé.

La Cartouche chargée avec l'échantillon peut être conservée pendant 8 heures avant utilisation.

Préparation de la console :

- Appuyez sur connexion : sélectionnez Demo et entrer en mot de passe : demo
 - Appuyez sur Nouveau Test (sur l'écran de la console)
 - Remplissez manuellement le numéro diamic de l'échantillon dans le champ prévu à cet effet.
 - Scannez le code-barres situé sur la face supérieure de la Cartouche à l'aide du lecteur de code-barres de la Console.
 - Ajoutez éventuellement un commentaire à inclure dans la demande de Test et dans le rapport de résultat du Test (ex : pourcentage des cellules tumorales)
 - Appuyez sur Confirmer pour finaliser la demande de Test.
 - Ouvrez le bac de l'Instrument en appuyant sur le bouton d'ouverture/fermeture du bac.
 - Placez la Cartouche dans le bac.
 - Fermez le bac de l'Instrument en appuyant sur le bouton d'ouverture/fermeture du bac.
- Le Test démarre automatiquement (durée de l'analyse 2h30). L'anneau lumineux blanc de l'Instrument reste allumé.
 - Nettoyez tout le matériel qui a été en contact avec l'échantillon (comme la pince à épiler) à l'aide d'un tissu imbibé d'éthanol à 70 % pour éviter une contamination d'un échantillon à l'autre.

Lorsque le Test est terminé, examinez les résultats obtenus sur la Console et transférez les sur une clé USB.

Conserver la cartouche fermée et identifiée au sein de la boîte en carton (si problème test la cartouche peut être analysé par Biocartis dans le cadre du protocole.)

CYCLE DE VALIDATION		
Rédaction	Vérification	Approbation
RIOT Adèle – Interne 14/11/2018		

Annexe 4 : Détails des délais en jours ouvrés de mise sous traitement des 25 patients mutés EGFR.

Pat.	Idylla™ (délai en jours)	NGS (délai en jours)	RCP (délai en jours)	Mise sous TTT (délai en jours)	Traitement reçu	Date des dernières nouvelles	Décès
1 CHU	4	12	5	7	ITK (Osimertinib)	19/07/2021	Non
2	8	18	13	8	ITK (Gefitinib)	15/04/2021	Oui
3	10	16	7	8	ITK (Afatinib)	11/03/2021	Oui
4	6	18	8	9	ITK (Osimertinib)	7/06/2021	Non
5	4	10	12	8	ITK (Osimertinib) hors essai	23/03/2021	Oui
6	5	16	10	9	ITK (Osimertinib) essai Melrose	23/07/2021	Non
7 CHU	4	12	6	9	ITK (Osimertinib)	07/06/2021	Non
8 CHU	8	15	10	10	ITK (Erlotinib)	12/02/2020	Oui
9	6	14	9	12	ITK (Gefitinib) - Essai apple	6/08/2021	Non
10	4	12	7	12	ITK (Osimertinib)	19/04/2021	Oui
11	6	13	8	15	ITK (Gefitinib)	18/08/2021	Non
12	4	13	4	20	ITK (Gefitinib)	10/12/2020	Oui
13	6	14	10	18	ITK (Gefitinib) - Essai apple	11/08/2021	Non
14	10	13	13	20	ITK (Gefitinib)	06/08/2021	Non
15 CHU	9	18	11	21	ITK (Erlotinib puis Osimertinib)	08/06/2021	Oui
16 CHU	10	19	14	22	Radiothérapie suivi d'une ITK (NR)	14/08/2020	Non

Idylla™ (jours) = délai en jours ouvrés du résultat Idylla™ à partir de la date de prélèvement.

NGS (jours) = délai en jours ouvrés du résultat NGS à partir de la date de prélèvement.

RCP (jours) = délai en jours ouvrés de la RCP à partir de la date de prélèvement.

TTT (jours) = délai en jours ouvrés de la mise en traitement à partir de la date de prélèvement.

Article

Contribution of the Idylla™ system to improving the therapeutic care of patients with NSCLC through early screening of EGFR mutations

Constance Petiteau ^{1,†}, Gwladys Robinet-Zimmermann ^{2,†}, Adèle Riot ^{3,†}, Marine Dorbeau ², Nicolas Richard ^{4,5}, Cécile Blanc-Fournier ², Frédéric Bibeau ³, Simon Deshayes ¹, Emmanuel Bergot ^{1,6}, Radj Gervais ⁷, Guénaëlle Levallet ^{3,5,6,*}

- ¹ Department of Pulmonology & Thoracic Oncology, CHU de Caen, F-14000 Caen, France.
- ² Department of Pathology, Centre François Baclesse, F-14000 Caen, France.
- ³ Department of Pathology, CHU de Caen, F-14000 Caen, France.
- ⁴ Normandy University, UNICAEN, Caen University Hospital, Department of Genetics, EA 7450 Bio-TARGen, Caen, France.
- ⁵ Federative structure of cyto-Molecular oncogenetics (SF-MOCAE), CHU de Caen, F-14000 Caen, France.
- ⁶ Normandy University, UNICAEN, CEA, CNRS, ISTCT unit, GIP CYCERON, F-14000 Caen, France.
- ⁷ Thoracic Oncology Department, Centre François Baclesse, Caen, France.

[†] Equal contribution

* Correspondence: guenaelle.levallet@unicaen.fr

Citation: Petiteau, C.; Robinet-Zimmermann, G.; Riot, A.; Dorbeau, M.; Richard, N.; Blanc-Fournier, C.; Bibeau, F.; Deshayes, S.; Bergot, E.; Gervais, R.; and Levallet, G. Contribution of the Idylla™ system to improving the therapeutic care of patients with NSCLC through early screening of EGFR mutations. *Curr. Oncol.* **2021**, *28*, Firstpage–Lastpage. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date
Accepted: date
Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Epidermal growth factor receptor (EGFR) genotyping, a critical examen for the treatment decisions of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), is commonly assayed by next-generation sequencing (NGS), but this global approach needs time. To determine whether rapid EGFR genotyping tests by the Idylla™ system guides earlier therapy decisions, EGFR mutations were assayed by both the Idylla™ system and NGS in 223 patients with NSCLC in a bicentric prospective study. Idylla™ demonstrated agreement with the NGS method in 187/194 cases (96.4%) and recovered 20 of the 26 (77%) EGFR mutations detected using NGS. Regarding the seven missed-mutations EGFR, five were not detected by the Idylla™ system, one was assayed in a sample with insufficient tumoral cells, and the last in a sample not validated by the Idylla™ system (a bone metastasis). Idylla™ did not detect any false positives. The average time between EGFR genotyping results from Idylla™ and the NGS method was 9.2 ± 2.2 working days (wd) (12.6 ± 4.0 calendar days (cd)). Subsequently, based on the Idylla™ method, the timeframe from tumor sampling to the initiation of EGFR-TKI was 7.7 ± 1.2 wd (11.4 ± 3.1 cd), while it was 20.4 ± 6.7 wd (27.5 ± 7.7 cd) with the NGS method ($p < 0.001$). We thus demonstrated here that the Idylla™ system contributes to improving the therapeutic care of patients with NSCLC by early screening of EGFR mutations.

Keywords: non-small cell lung cancer; molecular diagnosis; EGFR mutations; NGS; Idylla™

1. Introduction

Lung carcinoma remains the most common cause of cancer death worldwide. Nearly 85% of lung cancers are non-small cell lung cancer (NSCLC), and 15%, small cell lung cancer (SCLC). Accounting for approximately 50% of cases of NSCLC, adenocarcinoma (ADC) is the most prevalent histological subtype [1].

All histology combined, the prognosis of patients with NSCLC remains poor, with a five-year survival rate of 15%, NSCLC being most often diagnosed at an advanced (stages III and IV) and metastatic stage [2]. Surgery is therefore insufficient for the therapeutic care of these patients, who can then benefit from chemotherapy based on platinum salts, immunotherapy according to the tumor expression of PDL1 (programmed death-ligand

1), or targeted therapy depending on the molecular abnormalities detected in their tumor. PD-1 blockade alone or with platinum-based chemotherapy is indeed the first-line therapy (depending on the level of PDL1 expression) for non-targetable metastatic NSCLC, while never-smoking patients with NSCLC more often harbor a targetable molecular aberration. The natural history of NSCLC is actually linked to the occurrence of "driver" molecular abnormalities, among which are KRAS (24%), epidermal growth factor receptor (EGFR; 15%), ERBB2 (<5%), or BRAF (<5%) gene mutations; MET amplification (<5%); and ALK (<5%), ROS1 (<2%), or RET (<1%) gene rearrangements [3]. Patients with NSCLC and EGFR mutations or ALK or ROS1 gene rearrangement are eligible for first-line targeted therapy with the respective appropriate drug, resulting in greatly improved clinical outcomes [4-6]. The optimal therapy for each patient must be promptly identified to improve patient outcomes in advanced NSCLC. Considering this objective, the mutational profile of NSCLC tumors is essential for developing a more targeted approach in lung cancer treatment. The guidelines recommend searching for EGFR (exons 18–21), ROS1, KRAS, ALK, and PDL1 status in all new diagnosed advanced non-squamous NSCLC and advanced squamous cell carcinomas in never-smokers. The molecular testing turnaround time should not exceed 10 working days according to oncology and pathology societies [7]. Following the ADAURA study, EGFR mutation testing is also now recommended in patients with stage IB to IIIA resected EGFR mutation-positive NSCLC [8], but with less urgency in terms of the expected timeframe for the result.

Next-generation sequencing (NGS) using dedicated gene panels is the most common approach to detect EGFR mutations. This is a global analysis that detects other genomic alterations of interest (KRAS, HER2, BRAF, MET, STK11, PIK3CA, etc.). However, this approach is time consuming. The average expected time of a result of the analysis is ~15 days, when these results state the initiation of treatment of patients. Alternative techniques have been developed, such as the Idylla™ EGFR mutation assay, i.e. an automated real-time polymerase chain reaction detecting EGFR mutations with minimal delays for guiding clinical decisions and starting targeted therapies earlier. This assay detects both EGFR mutations (exon 19 deletions, exon 21 (L858R and L861Q), and exon 18 (G719A/C/S) mutations) associated with sensitivity to EGFR-TKIs [9-11] as the main mutations (mainly T790M and insertion in exon 20), predicting the resistance to EGFR-TKIs from the first or second generation but the response to EGFR-TKIs from the third generation [10, 11].

Previous studies have already reported the high concordance (from 94% to 100%) between the Idylla™ system and other methods routinely used for EGFR mutation detection from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue of human lung cancer (NGS: [12-22]; pyrosequencing: [23]; Therascreen® EGFR RGQ PCR: [24]; droplet digital PCR: [22]; ARMS PCR: [25]; fragment PCR: [26, 27]; multiplex PCR: [28]; real-time PCR (cobas® EGFR Mutation Test): [29]; Sanger sequencing: [29, 30]), usually through a retrospective and monocenter study, although sometimes prospective [13, 18, 28, 29, 31] and rarely multicentric [15]. Previous studies have thus evaluated the sensitivity, concordance, and reproducibility between NGS and alternative technical approaches of EGFR genotyping, but whether the early genotyping of EGFR can initiate more quickly the treatment of patients with NSCLC is not clearly answered in the literature.

Herein, through a prospective bicentric study, we aimed to assess the benefit of the early diagnosis of EGFR mutations in the therapeutic initiation in 225 patients with NSCLC, and thus define this benefit from the patient's point of view by evaluating delays in pathology processing and in initiation of therapy.

2. Materials and Methods

2.1. Patients from the ID-MUT study

From January 2019 to August 2020, 223 patients with NSCLC diagnosed by pathologists from Caen University Hospital (CHU; $n = 79$) and the François Baclesse Cen-

ter (CFB; $n = 144$) were routinely tested to evaluate EGFR mutations with both the reference methods, i.e., NGS and the Idylla™ system. We excluded from this study sample patients <18 years of age or with a poorly fixed sample.

The clinical data were recovered from electronic medical records, including the date of (1) tumor sampling, (2) multidisciplinary consultation meetings, (3) diagnosis announcement, and (4) initiation of anti-EGFR therapy.

Specific informed consent was obtained for the biological study (ID-MUT). The additional EGFR analysis by Idylla™ was approved by the appropriate ethics committee (CPP Ref DC 2008-574 Nord-Ouest III, France and Local Health Research Ethics Committee (CLERS ref ID#1595), France). In accordance with the French law n° 2018-493 of 20 June 2018 relating to the protection of personal data, a formally complete declaration file was sent to the National Commission for Data Protection (declaration number: 2204611 v 0).

2.2. EGFR mutation assay by Next-Generation Sequencing Panel CLv3 (Colon and Lung Cancer Panel v3)

Tumor genomic DNA was extracted from three sections of 10 μm of paraffin-embedded specimens using an RSC FFPE Plus DNA Kit (Promega™) on a Maxwell RSC 48 automated system (Promega™) according to the manufacturer's recommendation. The DNA concentration measured with NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific).

NGS was performed using S5 Prime (Thermo Fisher Scientific). The average depth was >500X; on target >90%. Bioinformatic analyses (alignment, call of variants, and annotations) was run on LifeTechnologies: Torrent suite 5.10, Variant caller 5.10, Ion reporter 5.10—Nextgene (Softgenetics) 2.4.1.2. The copy number variant (CNV) analysis was expressed as the ratio of mean depths by amplicons ± 2 standard deviations. The detection limit was set to 3% for punctual mutations and 5% for insertions/deletions for a minimum depth of 100X per amplicon. Variations of the sequences recognized as non-pathogenic (classes 1 and 2) were not mentioned. The allelic frequency of variation (VAF) of an alteration was evaluated, including panel CLv3 sequence exons 18–21 of the EGFR gene.

2.3. EGFR mutation assay by the Idylla™ System

EGFR mutation testing by the Idylla™ system was assayed from unextracted paraffin-embedded specimens according to an adaptation of the manufacturer's recommendation. Briefly, three sections of 20 μm thickness from the paraffin-embedded specimens were loaded into the Idylla™ EGFR Mutation cartridge for the following fully automated test previously described by others [32]. The EGFR mutations detected in the Idylla™ EGFR Mutation cartridge are listed in Supplemental Table S1.

PCR curves were visualized through the web-based interphase Idylla™ explore to evaluate the quantification cycle (CQ) from the mutation signal when found, the CQ for the internal control (total EGFR) signal, the difference between the two CQs (ΔCQ), the sigmoid aspect of the amplification curve of the mutation when found, and the maximal fluorescence, similarly to Momeni-Boroujeni and colleagues [32]. The total EGFR CQ for all samples averaged from 16 to 26.

2.4. Statistical analysis

Specificity and sensitivity were the proportion of concordant results against the sum of concordant and discordant results (true positives / (true positives + false negatives) and true negatives / (true negatives + false positives), as detailed by [24]. The man/woman distribution, smoking status and age of patients between NSCLC patient with or without EGFR mutation were evaluated using a chi-square test and a non-parametric test for unpaired data from Mann-Whitney. The influence of the "technic" variable (Idylla™ or NGS) on the time required for delivering EGFR genotyping results was evaluated by a two-way (techniques and time) analysis of variance (ANOVA), followed by a post-hoc Bonferroni test (GraphPad Software, Inc. USA).

Statistical differences of the timeframe according to the method used for EGFR genotyping (Idylla™ or NGS) were determined using a *t*-test (GraphPad Software, Inc. USA). Statistical significance was set at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Patients' characteristics (Table 1)

Table 1. Patients' characteristics.

	Total (n = 223)	CHU (n = 79)	CFB (n = 144)	Patients with EGFR mutation (n = 25)
Population				
Man	126 (56.5%)	47 (59.5%)	79 (54.8%)	8 (32.0%)
Women	97 (43.5%)	32 (40.5%)	65 (45.2%)	17 (68.0%)
Age (mean ± SD) years old [range] years old	65.4 ± 9.8 [36.5–89.8]	64.0 ± 9.2 [39.6–83.2]	66.2 ± 10.1 [36.5–89.8]	68.5 ± 10.1 [47.3–81.1]
Smoker status¹				
Never-smokers	39 (17.5%)	10 (14.1%)	29 (20.1%)	15 (60.0%)
Smokers ≤10 pack-years	9 (4.1%)	2 (2.8%)	7 (4.9%)	4 (16.0%)
Smokers >10 pack-years	167 (74.8%)	59 (83.1%)	108 (75.0%)	6 (24.0%)
Stage				
I (A/B)	7 (4/3) (%)	4 (2/2) (%)	3 (2/1) (%)	1 (1/0) (%)
II (A/B)	6 (2/4) (%)	3 (1/2) (%)	3 (1/2) (%)	1 (1/0) (%)
III (A/B/C)	31 (18/10/3) (%)	8 (4/4/0) (%)	23 (14/6/3) (%)	2 (2/0/0) (%)
IV(A/B)	164 (47/117) (%)	52 (10/42) (%)	112 (37/75) (%)	21 (7/14) (%)
Histology according to the WHO 2015 4th edition				
Adenocarcinoma (ADC)	164 (73.6%)	57 (72.1%)	107 (74.3%)	22 (88.0%)
o Mucinous subtype	o 1	o 1	o 0	o 0
o Papillary subtype	o 1	o 1	o 0	o 0
o Enteric subtype	o 3	o 3	o 0	o
NSCLC ² NOS ³	30 (13.4%)	12 (15.2%)	18 (12.5%)	0
NSCLC in favor of an ADC	21 (9.4%)	10 (12.6%)	11 (7.5%)	3 (12.0%)
Squamous cell carcinoma	6 (2.7%)	0	6 (4.1%)	0
Carcinoid tumor	1 (0.4%)	0	1 (0.7%)	0
Small cell carcinoma and compound ADC	1 (0.4%)	0	1 (0.7%)	0
Nature of tumoral sample				
Fibroendoscopy biopsy	87 (39.0%)	42 (53.2%)	45 (31.2%)	9 (36.0%)
Fine needle aspiration	57 (25.6%)	30 (38.0%)	27 (18.8%)	6 (24.0%)
Biopsy by scanner	42 (18.8%)	0	42 (29.2%)	6 (24.0%)
Ultrasound biopsy	30 (13.5%)	2 (2.5%)	28 (19.4%)	3 (12.0%)
Surgical biopsy	7 (3.1%)	5 (6.3%)	2 (1.4%)	1 (4.0%)
Localization				
Lung	112 (50.2%)	47 (59.5%)	65 (45.2%)	12 (48.0%)
Lymphadenopathy	61 (27.3%)	27 (34.2%)	34 (23.7%)	6 (24.0%)
Bone metastasis	20 (8.9%)	1 (1.3%)	19 (13.0%)	5 (20.0%)
Pleural metastasis	5 (2.3%)	1 (1.3%)	4 (2.8%)	0
Metastasis in other locations	21 (9.4%)	0	21 (14.6%)	1 (4.0%)
Brain	2 (0.9%)	2 (2.5%)	0	0
Pleural fluid	2 (0.9%)	1 (1.3%)	1 (0.7%)	1 (4.0%)

¹ Information missing for 8 patients; ² NSCLC, non-small lung cancer; ³ NOS, not otherwise specified.

In total, 223 patients (126 men and 97 women; medium age at diagnosis: 65.4 ± 9.8 years old) newly diagnosed with NSCLC, mostly adenocarcinomas or probable adenocarcinomas (83.1%), were enrolled in the ID-MUT study from January 2019 to August 2020 (Table 1).

We excluded from this study (i) patients not then treated at the CHU or CFB (n = 14), (ii) samples with insufficient material (tumor sample of less than 50 mm² and/or without sufficient tumor cells; n = 6), (iii) a malpighia metaplasia sample (n = 1), and (iv) samples without results for both the Idylla™ and NGS tests (n = 8) (Figure 1).

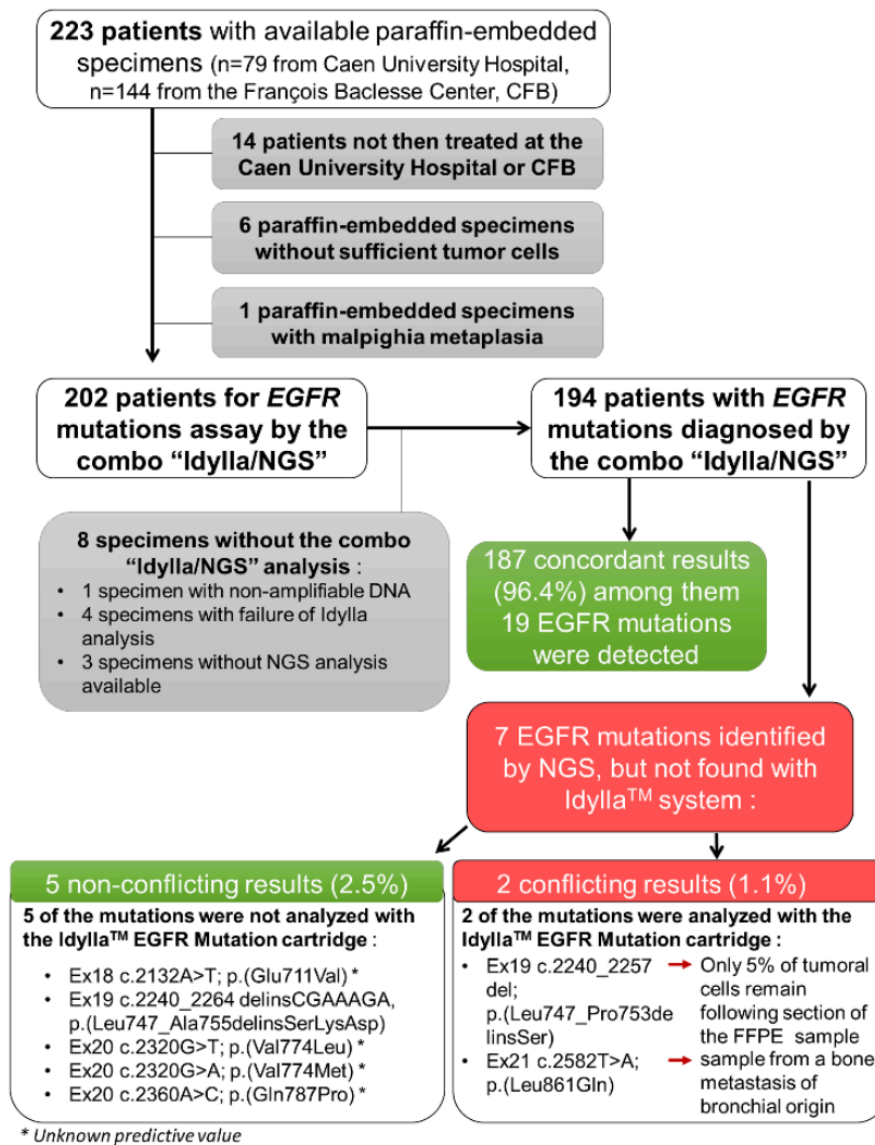


Figure 1. Flow chart of the ID-MUT study and concordance between the Idylla™ system and NGS genotyping for EGFR.

The final analysis was thus performed on 194 NSCLC samples (Figure 1). Of the 194 NSCLC samples tested, 149 (76.8%) were histological FFPE specimens and 45 (23.2%) were cytology specimens.

3.2. Concordance of EGFR genotyping between the Idylla™ and NGS methods

Of the 194 NSCLC samples tested, 25 (12.8%) were positive for EGFR mutations (including a sample with a double mutation (EGFR_ex20 c.2360A>C; p.(Gln787Pro) (Q787P)/EGFR_ex20 c.2369C>T; p.(Thr790Met) (T790M)) and 169 negatives (87.2%) using NGS, the benchmark analysis (Figure 1). Among these 25 patients, were a majority of women (n = 17 (68.0%); $p < 0.01$) and a majority of non-smokers (n = 15, (60%); p value < 0.001). With Idylla™, 19 (9.7%) and 175 (90.3%) cases were positive and negative, respectively, for EGFR mutations (Figure 1). Thus, Idylla™ demonstrated agreement with the NGS method in 187/194 cases (96.4%) and recovered 20 of the 27 (77%) EGFR mutations detected using NGS: 11 deletions in exon 19, seven L858R mutations; one T790M mutation, and one insertion in exon 20 from EGFR. In addition, Idylla™ did not detect any false positives.

However, seven EGFR mutations were detected by NGS but not by Idylla™: Five of these missed- mutations were not assayed by the Idylla™ system, and were therefore not true mismatches between Idylla™ and NGS. The two other missed mutations were mutations evaluated by Idylla™. However, one of them was missed probably because following the shavings of the FFPE block for Idylla™ to analyze, only 5% of the tumor cells remained in the sample (as a reminder, the sensitivity threshold of the Idylla™ technique is 10% of tumor cells). The second missed mutation was from a bone metastasis sample of an undifferentiated carcinoma presumed to be of pulmonary origin, because it was TTF1-positive. It should be noted that the Idylla™ system has not been certified for such type of sample.

3.3. Consideration of the EGFR genotyping by the Idylla™ method in the treatment decision

Among the 194 patients with EGFR mutations diagnosed by the combo “Idylla™/NGS”, 158 patients received first-line systemic treatment. For these 158 patients, EGFR genotyping results by Idylla™ were all reported before those by NGS. For the majority of these patients, i.e. 118/158 of them (75%), the multidisciplinary consultation meeting leading to the therapeutic decision took place with the knowledge of EGFR genotyping by the Idylla™ method and without the knowledge of the result of the analysis by NGS. For 23/158 patients, EGFR genotyping results were known. Finally, 17/158 patients (11%) were discussed in the multidisciplinary consultation meeting before the results of the mutation status of EGFR.

3.4. Turnaround time (TAT)

To appreciate the TAT of EGFR genotyping from the tumor sample to the initiation of EGFR-TKI treatment according to the NGS or Idylla™ method, we then measured the timeframe between (1) tumor sampling and EGFR genotyping prescription, (2) EGFR genotyping prescription and result, (3) tumoral sampling and EGFR genotyping result, (4) results from both techniques, and (5) tumoral sampling and initiation of treatment (Figure 2).

We expressed these times periods in both working (wd) and calendar (cd) days, calendar days being more representative for patients.

The TAT from tumor sampling to EGFR genotyping prescription was comparable whether genotyping was ordered from Idylla™ or performed using the NGS method, with a timeframe of 5.3 ± 3.6 wd (7.4 ± 5.1 cd) and 5.6 ± 3.7 wd (7.8 ± 5.1 cd), respectively (Figure 2A). By contrast, the TAT from the EGFR genotyping prescription to the EGFR genotyping results was almost six times faster with Idylla™ than with the NGS method, with a timeframe of 1.5 ± 1.3 wd (1.9 ± 1.8 cd) and 10.3 ± 2.0 wd (14.2 ± 3.5 cd), respectively ($p < 0.001$) (Figure 2A). The average time between EGFR genotyping results by Idylla™ and the NGS method was thus 9.2 ± 2.2 wd (12.6 ± 4.0 cd) (Figure 2A).

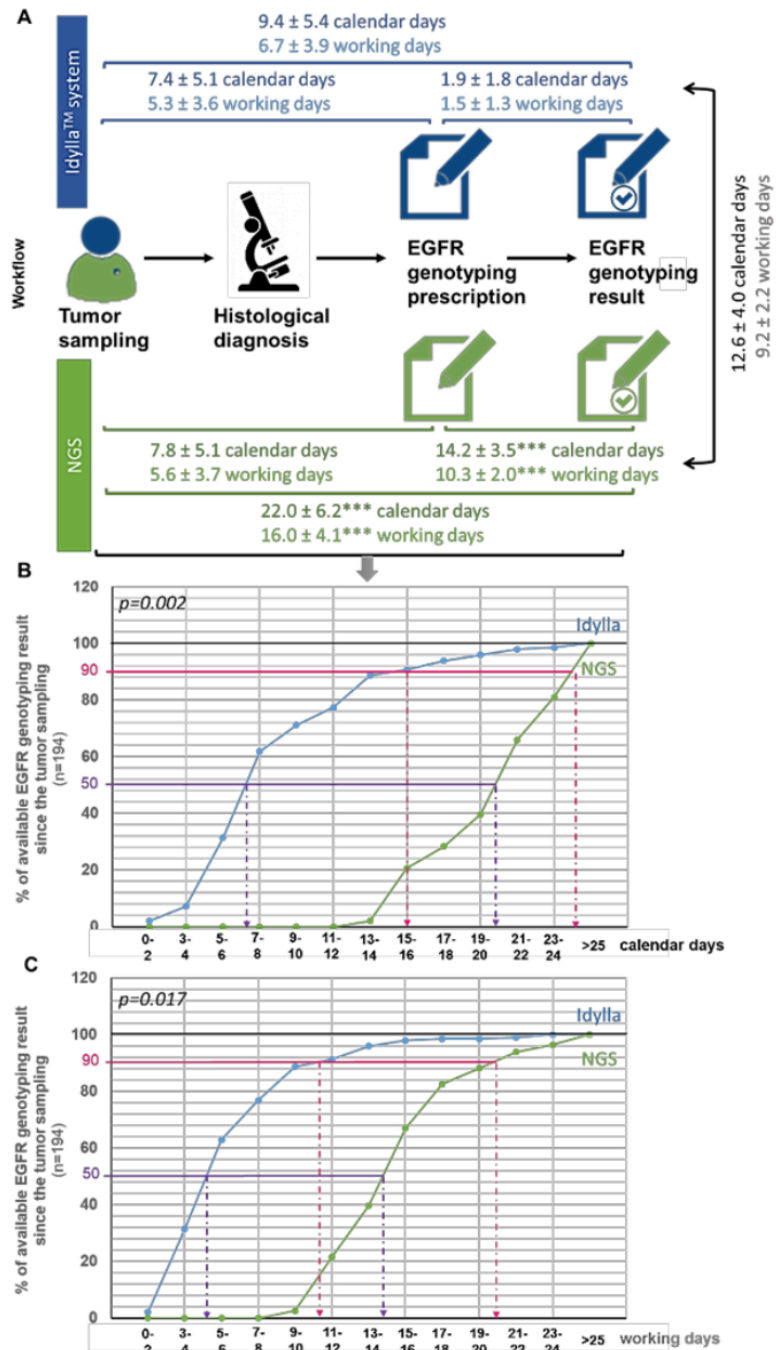


Figure 2. Turnaround time from the tumor sample to the initiation of treatment according to the NGS or Idylla™ method. (A) Workflow illustrating delays between each step toward the initiation of anti-EGFR therapy in calendar or working days (mean ± SD). Delays according to the Idylla™ system or NGS assay was tested using a *t*-test (***p* < 0.001 when compared in the same timeframe to the Idylla™ method). (B,C) Monitoring the availability of EGFR genotyping results by the Idylla™ or NGS technique from tumor sampling in calendar days (B) or working days (C). The influence of the "technique" variable (Idylla™ or NGS) on the time required for deliver EGFR genotyping results was evaluated by a two-way (techniques and time) analysis of variance (ANOVA), followed by a post-hoc Bonferroni test (GraphPad Software, Inc. USA).

219
220
221
222
223
224
225
226

Figure 2B,C illustrate the availability of EGFR genotyping since the tumor sampling in calendar days (Figure 2B) and working days (Figure 2C). As shown, for half of the patients from the ID-MUT study, the EGFR genotyping result was determined to be 6–7 cd (4–5 wd) after the tumor sampling with the Idylla™ method, against 19–20 cd (13–14 wd) for the NGS method. Similarly, for 90% of the patients from the ID-MUT study, the EGFR genotyping result was determined to be 15–16 cd (10–11 wd) after tumor sampling with the Idylla™ method, against 23–24 cd (19–20 wd) for the NGS method. The influence of the "technique" used (Idylla™ or NGS) on the time required for deliver EGFR genotyping results was evaluated by a two-way (technique and time) analysis of variance (ANOVA), followed by a post-hoc Bonferroni test, which confirmed statistically the time-saving benefit of the Idylla™ technique whether evaluated in cd ($p = 0.002$) or wd ($p = 0.0017$).

During the first part of the ID-MUT study (the first nine months), in one of the centers (Caen University Hospital), the EGFR genotyping results by both the Idylla™ and NGS methods were expected to initiate EGFR-TKI treatment, the time for the confirmation of EGFR genotyping concordance between the two methods in our hand. During the second part of this study, EGFR-TKI treatment was initiated on EGFR genotyping by Idylla™ in both Caen University Hospital and the François Baclesse Center. For this reason, among the 22 NSCLC patients from the ID-MUT study with EGFR mutations treated by EGFR-TKI, 12 NSCLC patients harboring EGFR mutations received treatment following EGFR genotyping by the NGS method, while the other 10 patients with NSCLC and EGFR mutations received EGFR-TKI treatment according EGFR genotyping by the Idylla™ system (i.e., before the EGFR genotyping result by NGS was known), allowing the evaluation of the contribution of the Idylla™ system to improving the therapeutic care of patients with NSCLC by early screening of EGFR mutations (Table 2). Table 2 details the timeframes for the available EGFR genotyping according to the Idylla™ or NGS method for each of the 22 patients, as well as the time required for the initiation of EGFR-TKI treatment since the tumor sample was processed.

Table 2. Turnaround time of initiation of EGFR-TKI in patients with NSCL harboring EGFR mutations according to EGR genotyping by the Idylla™ system or the NGS method.

Patient	Gender	Smoker status histology p. stage	EGFR mutation	Time for:		
				EGFR genotyping by Idylla™ *	EGFR genotyping by NGS *	EGFR-TKI Initiation *
18	F	Never-smoker NSCLC in favor of an ADC, IVB	ex19 c.2240_2257del; p.(Leu747_Pro753delinsSer)	5 cd	15 cd	12 cd on Idylla™
32	F	Never-smoker ADC, IVB	ex21 c.2573T>G; p.(Leu858Arg)	11 cd	20 cd	18 cd on Idylla™
40	F	≤10 pack-years ADC, IVB	ex19 c.2235_2249del; p.(Glu746_Ala750del)	5 cd	15 cd	8 cd on Idylla™
81	F	Never-smoker ADC, IVB	ex21 c.2573T>G; p.(Leu858Arg)	9 cd	23 cd	9 cd on Idylla™
96	F	Never-smoker ADC, IVB	ex19 c.2239_2248delinsC; p.(Leu747_Ala750delinsPro)	7 cd	17 cd	14 cd on Idylla™
171	F	>10 pack-years ADC, IVA	ex19 c.2240_2254del; p.(Leu747_Thr751del)	6 cd	21 cd	12 cd on Idylla™
183	F	Never-smoker ADC, IIIA	ex19 c.2235_2249del; p.(Glu746_Ala750del)	7 cd	23 cd	10 cd on Idylla™
187	F	≤10 Pack-years ADC, IVB	ex21 c.2573T>G; p.(Leu858Arg)	13 cd	21 cd	9 cd on Idylla™
193	F	Never-smoker ADC, IVA	ex21 c.2573_2579delinsGGCCAT; p.(Leu858_Lys860delinsArgAlaIle)	5 cd	13 cd	11 cd on Idylla™
				<i>Mean ± SD 11.4 ± 3.1 cd (7.7 ± 1.2 wd)</i>		

16	F	Never-smoker ADC, IVB	ex19 c.2235_2249del; p.(Glu746_Ala750del)	12 cd	23 cd	28 cd on NGS
20	F	Never-smoker ADC, IVB	ex21 c.2573T>G; p.(Leu858Arg)	16 cd	23 cd	45 cd on NGS
62	M	Never-smoker ADC, IVB	ex19 c2240_2254del p.(Leu747_Thr751del)	13 cd	26 cd	31 cd on NGS
84	M	>10 pack-years ADC, IVB	ex19 c2240_2254del; p.(Leu747_Thr751del), ex20 c.2305G>A; p.(Val769MET)	3 cd	16 cd	25 cd on NGS
85	M	Never-smoker ADC, IVA	ex19 c2236_2250del; p.(Glu746_Ala750del)	7 cd	19 cd	25 cd on NGS
97	F	Never-smoker ADC, IIIA	ex19 c.2235_2249del; p.(Glu746_Ala750del)	7 cd	16 cd	20 cd on NGS
105	F	Never-smoker ADC, IVB	ex21 c.2582T>A p.(Leu861Gln)	12 cd	22 cd	28 cd on NGS
110	F	Never-smoker ADC, IVA	ex18 c.2132A>T; p.(Glu711Val)	5 cd	15 cd	15 cd on NGS
134	M	≤10 pack-years ADC, IVB	ex20 c.2319_2320insTAC; p.(His773_Val774insTyr)	8 cd	22 cd	29 cd on NGS
162	F	≤10 pack-years NSCLC in favor of an ADC, IVB	ex 19 c.2240_2257del; p.(Leu747_Pro753delinsSer)	7 cd	16 cd	20 cd on NGS
194	M	>10 pack-years ADC, IVB	ex20 c.2320G>A; p.(Val774Met)	4 cd	11 cd	14 cd on NGS
211	F	Never-smoker ADC, IIA	ex21 c.2573T>G; p.(Leu858Arg)	13 cd	16 cd	27 cd on NGS

Mean ± SD 27.2 ± 8.3 cd (20.3 ± 6.7 wd)

* In calendar days (cd) or working day (wd) from tumor sampling.

The time to initiation of EGFR-TKI was defined as the time between the interventional procedures leading to the histological confirmation until initiation of TKIs for patients harboring EGFR mutations. The TAT from tumor sampling to initiation of EGFR-TKI was 7.7 ± 1.2 wd (11.4 ± 3.1 cd) when the decision was based on the Idylla™ method, while it was 20.3 ± 6.7 wd (27.2 ± 8.3 cd) when the decision was based on the NGS method, i.e., reduced by more than two-fold with the Idylla™ system ($p < 0.001$).

4. Discussion

In this study, we confirmed the good sensitivity and specificity of the rapid detection of EGFR mutations using the Idylla™ system and mainly reported that EGFR mutation detection with this assay is associated with a significantly reduced turnaround time compared to the use of NGS testing. In turn, patients were observed to begin systemic EGFR-TKIs therapy an average of two weeks earlier than if waiting for the NGS result.

The good sensitivity and specificity of the rapid detection of EGFR mutations using the Idylla™ system were previously reported in other publications on lung cancer, as well as on other cancers such as melanoma and colorectal cancer [17]. Similarly, as detailed in the introduction, the concordance of EGFR genotyping has already been reported between Idylla™ system and NGS [12-22] or others techniques [23-30]. In our center, we chose to introduce the Idylla™ system rather than another rapid assay, since our main objective was to reduce, at maximum, the result of the EGFR genotyping for clinicians and to reduce the need of DNA extraction being performed daily, not allowing this objective to be achieved. In fact, the Idylla™ system is one of the rare solutions avoiding DNA extraction and allowing reliable EGFR genotyping directly from FFPE sample slides [20, 25, 33-35] in all patients with advanced NSCLC, mainly adenocarcinomas and squamous cell carcinomas in never-smokers as in patients with stage IB to IIIA resected EGFR mutation-positive NSCLC [8]. However, the Idylla™ system has several limitations. First, biological

materials obtained from biopsies is often limited and can be an issue when multiple analyses are required. Indeed, the Idylla™ assay leads to additional sections of FFPE sample and therefore risks exhausting the tumor sample, especially since, contrary to what is recommended by Biocartis, which markets the Idylla™ EGFR cartridge, we did not perform EGFR genotyping on a single section of 5 µm but on three sections of 20 µm thickness from the paraffin-embedded specimens, since, in our hands, during preliminary tests, we observed that following the recommendations of Biocartis was a risk of missing out on an EGFR mutation with low allelic frequency. This limitation could, however, be lifted by the reuse of H&E, immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) diagnostic slides [36], by the use of plasma from patients with lung cancer [37, 38] or of the DNA extracted from FFPE sections for NGS analysis [14, 19, 26, 28, 39]. Indeed, using the same DNA for Idylla™ and NGS assays could discard divergent results linked to tumor heterogeneity and to the fact that the two analyses are not carried out on strictly the same part of the tumor sample. Moreover, only a little DNA is needed: Bocciarelli and coworkers reported that >25 ng of DNA and >10% of tumor cells are sufficient to detect EGFR mutations with the Idylla™ method [19]. DNA use seems a good alternative, however, and this is also the second limitation of the Idylla™ system—Idylla™ EGFR cartridges are not certified for samples other than primary tumor biopsies included in FFPE. This lack of certification is regrettable, but like others [13, 27, 30, 40], we also analyzed samples of other kinds (fine needle aspiration and metastasis of bronchial origin) on Idylla™ EGFR cartridges and, except for one of them, the results of EGFR genotyping were consistent with the analysis by NGS. As long as the result of the EGFR genotyping is confirmed in a second step by another technique, it seems to us that this second limitation can therefore be avoided.

Studies comparing Idylla™ system and NGS performance [12–22] reported a concordance between the two techniques ranging from 94% to 100%, which is consistent with the 96.7% of concordant results between the Idylla™ system and NGS that we evaluated here, especially since the seven apparent discordant results that we reported were not true discordant: Five missed mutations were not detected by the Idylla™ system, one missed mutation was assayed in a sample with insufficient tumoral cells, and the last missed mutation was sought in a sample not validated on the Idylla™ system (a bone metastasis).

That some mutations detected in the NGS panel were absent in the Idylla™ test panel is unfortunate, but most of the time with few consequences for the patient considering that approved therapies are missing for most of those missed mutations (insertion in exon 20 of the EGFR gene), and the others were finally found with the complementary analysis of the sample by NGS, as the C797S mutation, a second acquired resistance mutation, arising in tumors that have progressed after treatment for T790M+ disease and not detected in the Idylla™ system [41]. For us, the Idylla™ system or another rapid system of EGFR mutation detection is essential for reducing the timeframe of EGFR genotyping and initiating therapy in patients with lung cancer but cannot be the only analysis realized to process this genotyping because of the risk of missing some EGFR mutations, either in samples with few tumor cells or rare EGFR mutations not detected by rapid genotyping, but for which we will know soon whether they do or do not predict the response to EGFR-TKIs, and because NGS allows the analysis of a large panel of genes whose alterations (mutations and copy gain) can also guide the treatment decisions of patients with lung cancer. Considering the simultaneous evaluation of numerous genomic alterations across several genes with NGS, and even if the system is presented as can be available in any laboratory, since it does not require a molecular biologist, we believe that the links between these laboratories and platforms equipped with NGS technology must be preserved. NGS panels remain essential in molecular sub-types diagnosis of lung cancer and cannot be replaced due to the rapid emergence of new targeted therapies for different genomic alterations. Then, it screens mutations that allow some patients to be included into clinical trials. Molecular testing is also essential in the treatment strategy because

studies have demonstrated that immunotherapy before targeted therapies increases the occurrence of serious side effects [42–44]. While comprehensive molecular screening is essential in academic centers with access to clinical trials, it is questionable in smaller centers who do not have access to NGS assays. In those centers, Idylla™ assays can be part of the solution to improving the time to initiate therapies.

Molecular testing requires a good-quality sample, enough tumor cells, and even multiple interventional procedures to be conclusive, which would lengthen delays. In 2016, a survey from the French National Cancer Institute showed that the median turnaround time (TAT) from test prescription to reception of results by the clinician for EGFR molecular test was 18 days [7]. A limitation with the NGS technique is the TAT is usually longer than the TAT associated with a specific assay. However, a delayed turnaround time for biomarker reports can lead to delays in treatment initiation, decreased efficacy of treatment, and inappropriate treatment decisions. Indeed, EGFR mutations are an oncogenic driver occurring especially in patients with pulmonary adenocarcinoma and never-smokers. For patients with metastatic NSCLC harboring EGFR mutations, the development of EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs) is an important improvement in therapeutic care, as shown by the increase in the progression-free survival (PFS) and limitation of toxicities using EGFR TKIs for patients with EGFR-mutated NSCLC compared to chemotherapy [5], especially with the use of osimertinib versus first-line TKIs (gefitinib and erlotinib) [4, 6]. However, a long delay to initiate EGFR TKIs can result in rapid disease progression and deterioration in performance status associated with a worse prognosis [45]. Thus, it is essential to accelerate the availability of molecular sub-type results. Because pathology processing is reduced with rapid techniques, we were able to obtain a result for EGFR genotyping 12.5 calendar days earlier with Idylla™ compared to NGS assays. As a consequence, the TAT from tumor sampling to initiation of EGFR-TKIs was reduced by two when decision was based on the Idylla™ method compared to when the decision was based on the NGS method. Besides faster delivery of the appropriate treatment for patients with NSCLC, and therefore increasing their chance of survival, we can also assume that by improving the deadlines, we can improve patients' adherence to participating in clinical trials.

5. Conclusions

This study demonstrated, for the first time and to the best of our knowledge, the benefit for the patient of the introduction into routine practice of the rapid EGFR genotyping test, in addition to the NGS in the initiation of its therapeutic care. EGFR mutation assays by the Idylla™ system, in addition to NGS testing, increase the costs of patient care but improve it through the timely completion of biomarker results and the facilitation of appropriate treatment decisions [46].

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Table S1: Mutations detected with the Idylla™ EGFR Mutation cartridge.

Author Contributions: Conceptualization, F.B., E.B., R.G., and G.L.; methodology, C.P., A.R., and G.L.; software, C.P., A.R., and G.L.; validation, G.L.; formal analysis, C.P., A.R., and G.L.; investigation, C.P., G.R.Z., and A.R.; resources, C.P., G.R.Z., and A.R.; data curation, C.P., G.R.Z., A.R., and N.R.; writing—original draft preparation, C.P., A.R., and G.L.; writing—review and editing, all authors; supervision, F.B., E.B., and G.L.; project administration, G.L.; funding acquisition, F.B., E.B., and G.L. All authors read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by AstraZeneca and INNOV_ECAIR, a unit from the Caen University Hospital Center.

Institutional Review Board Statement: The ID-MUT study was approved by the appropriate ethics committee (CLERS ref ID#1595, France). In accordance with the French law n° 2018-493 of 20 June 2018 relating to the protection of personal data, a formally complete declaration file was sent to the National Commission for Data Protection (CNIL; declaration number: 2204611 v 0).

Informed Consent Statement: Written informed consent was obtained from the patient(s) to publish this paper. 392
393

Data Availability Statement: All data are stored at the CHU of Caen and CFB center and can be made available upon request. 394
395
396

Acknowledgments: The authors thank all of the onco-pulmonologists and anatomopathologists from Caen University Hospital and the François Baclesse Center that contributed to this study; Mrs Sylvie Lecot-Cotigny, Géraldine Lefevre, and Roseline Patey for their technical support in the realization of this study; and Mr Vincent Léon, Clinical Research Associate at Caen University Hospital, for his support in this project. 397
398
399
400
401

Conflicts of Interest: G.L. received 22 batches of six EGFR Idylla™ tests (Biocartis®) from Astra-Zeneca. FB received payment for participating in international meetings from Amgen, AstraZeneca, BMS, MSD and Sanofi. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results. The other authors declare no conflicts of interest. 402
403
404
405
406

407

References

408

1. Hutchinson, B.D.; Shroff, G.S.; Truong, M.T.; Ko, J.P. Spectrum of Lung Adenocarcinoma. *Semin. Ultrasound CT MR*. **2019**, *40*(3), 255-264. 409
410
2. Riihimäki, M.; Hemminki, A.; Fallah, M.; Thomsen, H.; Sundquist, K.; Sundquist, J.; Hemminki, K. Metastatic sites and survival in lung cancer. *Lung Cancer* **2014**, *86*(1), 78-84. 411
412
413
3. Berge, E.M.; Doebele, R.C. Targeted therapies in non-small cell lung cancer: emerging oncogene targets following the success of epidermal growth factor receptor. *Semin. Oncol.* **2014**, *41*(1), 110-25. 414
415
4. Soria, J.C.; Ohe, Y.; Vansteenkiste, J.; Reungwetwattana, T.; Chewaskulyong, B.; Lee, K.H.; Dechaphunkul, A.; Imamura, F.; Nogami, N.; Kurata, T.; Okamoto, I.; Zhou, C.; Cho, B.C.; Cheng, Y.; Cho, E.K.; Voon, P.J.; Planchard, D.; Su, W.C.; Gray, J.E.; Lee, S.M.; Hodge, R.; Marotti, M.; Rukazenkov, Y.; Ramalingam, S.S.; FLAURA Investigators. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*(2), 113-125. 416
417
418
419
5. Recondo, G.; Facchinetti, F.; Olaussen, K.A.; Besse, B.; Friboulet, L. Making the first move in EGFR-driven or ALK-driven NSCLC: first-generation or next-generation TKI? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2018**, *15*(11), 694-708. 420
421
6. Ramalingam, S.S.; Vansteenkiste, J.; Planchard, D.; Cho, B.C.; Gray, J.E.; Ohe, Y.; Zhou, C.; Reungwetwattana, T.; Cheng, Y.; Chewaskulyong, B.; Shah, R.; Cobo, M.; Lee, K.H.; Cheema, P.; Tiseo, M.; John, T.; Lin, M.C.; Imamura, F.; Kurata, T.; Todd, A.; Hodge, R.; Saggese, M.; Rukazenkov, Y.; Soria, J.C.; FLAURA Investigators. Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*(1), 41-50. 422
423
424
425
7. INCa (French National Cancer Institute). <https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Access-aux-tests-moleculaires-EGFR-RAS-et-BRAF-Resultats-d-une-enquete-dans-5-regions-francaises> 426
427
8. Wu, Y.L.; Tsuboi, M.; He, J.; John, T.; Grohe, C.; Majem, M.; Goldman, J.W.; Laktionov, K.; Kim, S.W.; Kato, T.; Vu, H.V.; Lu, S.; Lee, K.Y.; Akewanlop, C.; Yu, C.J.; de Marinis, F.; Bonanno, L.; Domine, M.; Shepherd, F.A.; Zeng, L.; Hodge, R.; Atasoy, A.; Rukazenkov, Y.; Herbst, R.S.; ADAURA Investigators. Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*(18), 1711-1723. 428
429
430
431
9. Cooper, W.A.; Lam, D.C.; O'Toole, S.A.; Minna, J.D. Molecular biology of lung cancer. *J. Thorac. Dis.* **2013**, *5*(S5), S479-90. 432
10. Planchard, D.; Popat, S.; Kerr, K.; Novello, S.; Smit, E.F.; Faivre-Finn, C.; Mok, T.S.; Reck, M.; Van Schil, P.E.; Hellmann, M.D.; Peters, S.; ESMO Guidelines Committee. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **2018**, *29*(Suppl 4), iv192-iv237. 433
434
435
11. NCCN Guidelines Version 4. 2019 Non-small cell lung cancer. 436
12. Lambros, L.; Caumont, C.; Guibourg, B.; Barel, F.; Quintin-Roué, I.; Marcorelles, P.; Merlio, J.P.; Uguen, A. Evaluation of a fast and fully automated platform to diagnose EGFR and KRAS mutations in formalin-fixed and paraffin-embedded non-small cell lung cancer samples in less than one day. *J. Clin. Pathol.* **2017**, *70*(6), 544-549. 437
438
439
13. Thomas De Montpréville, V.; Ghigna, M.R.; Lacroix, L.; Lemoine, A.; Besse, B.; Mercier, O.; Fadel, É.; Dorfmüller, P.; Le Chevalier, T.; Institut d'Oncologie Thoracique. EGFR and KRAS molecular genotyping for pulmonary carcinomas: Feasibility of a simple and rapid technique implementable in any department of pathology. *Pathol. Res. Pract.* **2017**, *213*(7), 793-798. 440
441
442
14. De Luca, C.; Rappa, A.G.; Gragnano, G.; Malapelle, U.; Troncone, G.; Barberis, M. Idylla assay and next generation sequencing: an integrated EGFR mutational testing algorithm. *J. Clin. Pathol.* **2018**, *71*(8), 745-750. 443
444
15. Evrard, S.M.; Taranchon-Clermont, E.; Rouquette, I.; Murray, S.; Dintner, S.; Nam-Apostolopoulos, Y.C.; Bellosillo, B.; Varela-Rodriguez, M.; Nadal, E.; Wiedorn, K.H.; Melchior, L.; Andrew, E.; Jones, M.; Ridgway, J.; Frykman, C.; Lind, L.; Rot, M.; Kern, 445
446

- I.; Speel, E.J.M.; Roemen, G.M.J.M.; Trincerri, N.; Freiburger, S.N.; Rechsteiner, M. Multicenter Evaluation of the Fully Automated PCR-Based Idylla EGFR Mutation Assay on Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue of Human Lung Cancer. *J. Mol. Diagn.* **2019**, *21*(6), 1010-1024. 447-449
16. Al-Turkmani, M.R.; Suriawinata, M.A.; Deharvengt, S.J.; Green, D.C.; Black, C.C.; Shirai, K.; Dragnev, K.H.; Tsongalis, G.J. Rapid EGFR mutation testing in lung cancer tissue samples using a fully automated system and single-use cartridge. *Pract. Lab. Med.* **2020**, *20*, e00156. 450-452
17. Colling, R.; Bancroft, H.; Langman, G.; Soilleux, E. Fully automated real-time PCR for EGFR testing in non-small cell lung carcinoma. *Virchows Arch* **2019**, *474*(2), 187-192. 453-454
18. Chevalier, L.M.; Billaud, A.; Passot, C.; Renoult, A.; Bigot, F.; Verrière, V.; Morel, A. EGFR molecular characterization in non-small cell bronchic cancer: comparative prospective study by NGS and Idylla platform technologies. *Ann. Pathol.* **2020**, *40*(5), 389-400. 455-457
19. Bocciarelli, C.; Cohen, J.; Pelletier, R.; Tran Van Nhieu, J.; Derman, J.; Favre, L.; Bourgogne, A.; Monnet, I.; Chouaid, C.; Pujals, A. Evaluation of the Idylla system to detect the EGFR T790M mutation using extracted DNA. *Pathol Res Pract.* **2020**, *216*(1), 152773. 458-459
20. Van Haele, M.; Vander Borgh, S.; Ceulemans, A.; Wieërs, M.; Metsu, S.; Sagaert, X.; Weynand, B. Rapid clinical mutational testing of KRAS, BRAF and EGFR: a prospective comparative analysis of the Idylla technique with high-throughput next-generation sequencing. *J. Clin. Pathol.* **2020**, *73*(1), 35-41. 460-462
21. Haiduk, T.; Brockmann, M.; Tillmann, R.L.; Pieper, M.; Lüsebrink, J.; Schildgen, V.; Schildgen, O. Comparison of Biocartis IDYLLA™ cartridge assay with Qiagen GeneReader NGS for detection of targetable mutations in EGFR, KRAS/NRAS, and BRAF genes. *Exp. Mol. Pathol.* **2021**, *120*, 104634. 463-465
22. Lee, E.; Jones, V.; Topkas, E.; Harraway, J. Reduced sensitivity for EGFR T790M mutations using the Idylla EGFR Mutation Test. *J. Clin. Pathol.* **2021**, *74*(1), 43-47. 466-467
23. Ilie, M.; Butori, C.; Lassalle, S.; Heeke, S.; Piton, N.; Sabourin, J.C.; Tanga, V.; Washetine, K.; Long-Mira, E.; Maitre, P.; Yazbeck, N.; Bordone, O.; Lespinet, V.; Leroy, S.; Cohen, C.; Mouroux, J.; Marquette, C.H.; Hofman, V.; Hofman, P. Optimization of EGFR mutation detection by the fully-automated qPCR-based Idylla system on tumor tissue from patients with non-small cell lung cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*(61), 103055-103062. 468-471
24. Delgado-García, M.; Weynand, B.; Gómez-Izquierdo, L.; Hernández, M.J.; Blanco, Á.M.; Varela, M.; Matias-Guiu, X.; Nadal, E.; Márquez-Lobo, B.; Alarcão, A.; de Álava, E.; Biscuola, M. Clinical performance evaluation of the Idylla™ EGFR Mutation Test on formalin-fixed paraffin-embedded tissue of non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* **2020**, *20*(1), 275. 472-474
25. Kaanane, H.; El Attar, H.; Louahabi, A.; IGOT CASA, Berradi, H.; Idrissi, H.H.; Khyatti, M.; Nadifi, S. Targeted methods for molecular characterization of EGFR mutational profile in lung cancer Moroccan cohort. *Gene* **2019**, *705*, 36-43. 475-476
26. De Luca, C.; Gragnano, G.; Pisapia, P.; Vigliar, E.; Malapelle, U.; Bellecicine, C.; Troncone, G. EGFR mutation detection on lung cancer cytological specimens by the novel fully automated PCR-based Idylla EGFR Mutation Assay. *J. Clin. Pathol.* **2017**, *70*(4), 295-300. 477-479
27. De Luca, C.; Conticelli, F.; Leone, A.; Gragnano, G.; Salatiello, M.; Galasso, P.; Pisapia, P.; Grillo, L.R.; Iaccarino, A.; Vigliar, E.; Bellecicine, C.; Malapelle, U.; Troncone, G. Is the Idylla EGFR Mutation Assay feasible on archival stained cytological smears? A pilot study. *J. Clin. Pathol.* **2019**, *72*(9), 609-614. 480-482
28. Dagogo-Jack, I.; Azzolli, C.G.; Fintelmann, F.; Mino-Kenudson, M.; Farago, A.F.; Gainor, J.F.; Jiang, G.; Piotrowska, Z.; Heist, R.S.; Lennes, I.T.; Temel, J.S.; Mooradian, M.J.; Lin, J.J.; Digumarthy, S.R.; Batten, J.M.; Robinson, H.; Nose, V.; Rivera, M.; Nardi, V.; Dias-Santagata, D.; Le, L.P.; Sequist, L.V.; Pitman, M.; Shepard, J.O.; Shaw, A.T.; Iafrate, A.J.; Lennerz, J.K. Clinical Utility of Rapid EGFR Genotyping in Advanced Lung Cancer. *JCO Precis. Oncol.* **2018**; *PO.17*, 00299. 483-486
29. Sousa, A.C.; Silveira, C.; Janeiro, A.; Malveiro, S.; Oliveira, A.R.; Felizardo, M.; Nogueira, F.; Teixeira, E.; Martins, J.; Carmo-Fonseca, M. Detection of rare and novel EGFR mutations in NSCLC patients: Implications for treatment-decision. *Lung Cancer* **2020**, *139*, 35-40. 487-489
30. Boureille, A.; Ferraro-Peyret, C.; Pontarollo, G.; Confavreux, C.; Pialat, J.B.; Isaac, S.; Forest, F.; Yvovet, V.; Watkin, E.; Girard, N.; Brevet, M. Rapid detection of EGFR mutations in decalcified lung cancer bone metastasis. *J Bone Oncol* **2020**, *21*, 100277. 490-491
31. Lassalle, S.; Hofman, V.; Heeke, S.; Benzaquen, J.; Long, E.; Poudenx, M.; Lantéri, E.; Boutros, J.; Tanga, V.; Zahaf, K.; Lalvée, S.; Lespinet, V.; Bordone, O.; Félix, J.M.; Bonnetaud, C.; Marquette, C.; Ilie, M.; Hofman, P. Targeted Assessment of the EGFR Status as Reflex Testing in Treatment-Naive Non-Squamous Cell Lung Carcinoma Patients: A Single Laboratory Experience (LPCE, Nice, France). *Cancers (Basel)* **2020**, *12*(4), 955. 492-495
32. Momeni-Boroujeni, A.; Salazar, P.; Zheng, T.; Mensah, N.; Rijo, I.; Dogan, S.; Yao, J.; Moun, C.; Vanderbilt, C.; Benhamida, J.; Chang, J.; Travis, W.; Rekhman, N.; Ladanyi, M.; Nafa, K.; Arcila, M.E. Rapid EGFR Mutation Detection Using the Idylla Platform: Single-Institution Experience of 1200 Cases Analyzed by an In-House Developed Pipeline and Comparison with Concurrent Next-Generation Sequencing Results. *J. Mol. Diagn.* **2021**, *23*(3), 310-322. 496-499
33. Heeke, S.; Hofman, P. EGFR Mutation Analysis in Non-small Cell Lung Carcinoma from Tissue Samples Using the Fully Automated Idylla™ qPCR System. *Methods Mol. Biol.* **2019**, *2054*, 147-155. 500-501
34. Huang, H.; Springborn, S.; Haug, K.; Bartow, K.; Samra, H.; Menon, S.; Mackinnon, A.C. Evaluation, Validation, and Implementation of the Idylla System as Rapid Molecular Testing for Precision Medicine. *J. Mol. Diagn.* **2019**, *21*(5), 862-872. 502-503
35. Hawkins, P.; Stevenson, T.; Powari, M. Use of the Idylla EGFR Mutation Test for Variant Detection in Non-Small Cell Lung Cancer Samples. *Am. J. Clin. Pathol.* **2021**, *aqab003*. 504-505

36. Nunnari, J.; Graziano, P.; Muscarella, L.A.; Rossi, A.; Grillo, L.R.; Montrone, G.; Di Lorenzo, A.; Bronzini, M.; Leone, A. Rapid EGFR evaluation from used H&E, IHC and FISH diagnostic slides with the Idylla platform. *J. Clin. Pathol.* **2021**, *jclinpath-2020*, 07315. 506-508
37. Heeke, S.; Hofman, V.; Benzaquen, J.; Otto, J.; Tanga, V.; Zahaf, K.; Allegra, M.; Long-Mira, E.; Lassalle, S.; Marquette, C.H.; Ilie, M.; Hofman, P. Detection of EGFR Mutations From Plasma of NSCLC Patients Using an Automatic Cartridge-Based PCR System. *Front Pharmacol.* **2021**, *12*, 657743. 509-511
38. Gilson, P.; Saurel, C.; Salleron, J.; Husson, M.; Demange, J.; Merlin, J.L.; Harlé, A. Evaluation of the Idylla ctEGFR mutation assay to detect EGFR mutations in plasma from patients with non-small cell lung cancers. *Sci. Rep.* **2021**, *11(1)*, 10470. 512-513
39. Grant, J.; Stanley, A.; Balbi, K.; Gerrard, G.; Bennett, P. Performance evaluation of the Biocartis Idylla EGFR Mutation Test using pre-extracted DNA from a cohort of highly characterised mutation positive samples. *J. Clin. Pathol.* **2021**, *jclinpath-2020*, 207338. 514-515
40. Arcila, M.E.; Yang, S.R.; Momeni, A.; Mata, D.A.; Salazar, P.; Chan, R.; Elezovic, D.; Benayed, R.; Zehir, A.; Buonocore, D.J.; Rekhtman, N.; Lin, O.; Ladanyi, M.; Nafa, K. Ultrarapid EGFR Mutation Screening Followed by Comprehensive Next-Generation Sequencing: A Feasible, Informative Approach for Lung Carcinoma Cytology Specimens With a High Success Rate. *JTO Clin. Res. Rep.* **2020**, *1(3)*, 100077. 516-519
41. Wang, S.; Tsui, S.T.; Liu, C.; Song, Y.; Liu, D. EGFR C797S mutation mediates resistance to third-generation inhibitors in T790M-positive non-small cell lung cancer. *J. Hematol. Oncol.* **2016**, *9(1)*, 59. 520-521
42. Lisberg, A.; Cummings, A.; Goldman, J.W.; Bornazyan, K.; Reese, N.; Wang, T.; Coluzzi, P.; Ledezma, B.; Mendenhall, M.; Hunt, J.; Wolf, B.; Jones, B.; Madrigal, J.; Horton, J.; Spiegel, M.; Carroll, J.; Gukasyan, J.; Williams, T.; Sauer, L.; Wells, C.; Hardy, A.; Linares, P.; Lim, C.; Ma, L.; Adame, C.; Garon, E.B. A Phase II Study of Pembrolizumab in EGFR-Mutant, PD-L1+, Tyrosine Kinase Inhibitor Naïve Patients With Advanced NSCLC. *J. Thorac. Oncol.* **2018**, *13(8)*, 1138-1145. 522-525
43. Lin, J.J.; Chin, E.; Yeap, B.Y.; Ferris, L.A.; Kamesan, V.; Lennes, I.T.; Sequist, L.V.; Heist, R.S.; Mino-Kenudson, M.; Gainor, J.F.; Shaw, A.T. Increased Hepatotoxicity Associated with Sequential Immune Checkpoint Inhibitor and Crizotinib Therapy in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2019**, *14(1)*, 135-140. 526-528
44. Oshima, Y.; Tanimoto, T.; Yuji, K.; Tojo, A. EGFR-TKI-Associated Interstitial Pneumonitis in Nivolumab-Treated Patients With Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol.* **2018**, *4(8)*, 1112-1115. 529-530
45. Blanc-Durand, F.; Florescu, M.; Tehfe, M.; Routy, B.; Alameddine, R.; Tran-Thanh, D.; Blais, N. Improvement of EGFR Testing over the Last Decade and Impact of Delaying TKI Initiation. *Curr. Oncol.* **2021**, *28(2)*, 1045-1055. 531-532
46. Le Flahec, G.; Guibourg, B.; Marcourelles, P.; Uguen, A. Financial implications of Idylla testing in colorectal cancer, lung cancer and melanoma: a French laboratory point of view. *J. Clin. Pathol.* **2017**, *70(10)*, 906-907. 533-535

« Par délibération de son Conseil en date du 10 Novembre 1972, l'Université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ou mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs ».

VU, le Président de Thèse

VU, le Doyen de la Faculté

VU et permis d'imprimer
en référence à la délibération
du Conseil d'Université
en date du 14 Décembre 1973

Pour le Président
de l'Université de CAEN et P.O

Le Doyen

ANNEE DE SOUTENANCE : 2021

NOM ET PRENOM DE L'AUTEUR : RIOT Adèle

TITRE DE LA THESE : ETUDE ID-MUT : Mise en place de la détermination des mutations de l'EGFR par technique Idylla™ dans le cancer du poumon - évaluation chez 225 patients du CHU de Caen et du Centre de Lutte Contre le Cancer François Baclesse de Caen.

RESUME DE LA THESE EN FRANÇAIS :

Dans les carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBPNPC) et non-épidermoïdes au stade avancé, la première ligne de traitement ne doit se décider qu'avec la connaissance des mutations drivers (*ROS1*, *ALK* et *EGFR*) et du statut PD-L1.

A Caen, la mise en place de la technique rapide Idylla™ EGFR a été motivée par les cliniciens pour accélérer la prise en charge de leurs patients.

Le but de l'étude prospective ID-MUT était de mettre en place et d'évaluer une analyse ciblée rapide de la mutation *EGFR* par technique Idylla™ et de la comparer à la technique par séquençage nouvelle génération (NGS) ion Torrent sur une cohorte de 225 patients suivis à Caen.

Au total, 194 échantillons tumoraux de patients atteints d'un CBPNPC fixés au formol et inclus en paraffine ont été testés simultanément par les deux techniques. La comparaison a porté sur la concordance et le délai d'analyse des deux techniques.

La concordance totale était excellente : 98,95% (188/190). Seuls 6 cas étaient discordants : 2 faux négatifs et 4 exclus de l'analyse en raison d'une mutation non objectivable par la technique Idylla™. Les délais d'analyse de la technique Idylla™ était de 6,6 jours ouvrés *versus* 15,8 jours ouvrés pour la technique NGS (p value <0,001).

La technologie Idylla™, simple d'utilisation permet la caractérisation sensible et rapide d'une majorité des mutations *EGFR* et peut être optimisée en exploitant les courbes d'amplification avec l'outil Idylla™ Explore ou en augmentant la quantité de matériel initial. Cependant l'utilisation d'ADN préalablement extrait peut-être judicieuse afin d'optimiser le matériel, car une analyse complémentaire par NGS reste indispensable.

MOTS CLES : Carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules, marqueurs théranostiques, mutation EGFR, NGS, Idylla™.

TITRE DE LA THESE EN ANGLAIS : ID-MUT STUDY: Establishment of the determination of EGFR mutations by Idylla™ technique in lung cancer – evaluation based on 225 patients of the CHU de Caen and the Centre de Lutte Contre le Cancer François Baclesse.

RESUME DE LA THESE EN ANGLAIS :

In advanced non-small-cell lung carcinomas (NSCLC) and non-epidermoid, the first line of treatment should be decided only with knowledge of driver mutations (*ROS1*, *ALK* and *EGFR*) and PD-L1 status.

In Caen, the implementation of the Idylla™ EGFR rapid technique was motivated by clinicians in order to speed-up their patients care/treatment.

The purpose of the prospective ID-MUT study was to develop and evaluate a rapid targeted analysis of the EGFR mutation by Idylla™ technique and compare it to the Next Generation Sequencing (NGS) ion Torrent technique on a cohort of 225 patients followed at Caen.

A total of 194 tumors samples from patients with formalin-fixed and paraffin-embedded CBPNPC have been simultaneously tested using both techniques. The comparison focused on the concordance and time to analyze the two techniques. The total agreement was excellent: 98.95% (188/190). Only 6 cases were inconsistent: 2 false negatives and 4 excluded from the analysis due to a non-objectifiable mutation by the Idylla™ technique. The analysis time of the Idylla™ technique was 6.6 working days *versus* 15.8 working days for the NGS technique (p value <0.001).

The easy-to-use Idylla™ technology allows the sensitive and rapid characterization of a majority of EGFR mutations and can be optimized by using the Idylla™ Explore tool exploiting the amplification curves or increasing the amount of initial hardware.

However, the use of previously extracted DNA may be judicious in order to optimize the material, as further analysis by NGS remains essential.

KEY WORDS: Non-small-cell lung carcinomas, theragnostic markers, EGFR mutation, NGS, Idylla™.