



HAL
open science

Analyse de performances analytiques pour la détection non invasive des mutations activatrices et des mécanismes de résistance dans les cancers bronchopulmonaires

Gauthier Corre

► To cite this version:

Gauthier Corre. Analyse de performances analytiques pour la détection non invasive des mutations activatrices et des mécanismes de résistance dans les cancers bronchopulmonaires. Médecine humaine et pathologie. 2023. dumas-04095830

HAL Id: dumas-04095830

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04095830v1>

Submitted on 12 May 2023

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 CLERMONT AUVERGNE
UFR DE MÉDECINE ET DES PROFESSIONS PARAMÉDICALES

THÈSE D'EXERCICE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

par

CORRE, Gauthier

Présentée et soutenue publiquement le 28 avril 2023

Analyse de performances analytiques pour la détection non invasive
des mutations activatrices et des mécanismes de résistance dans les cancers broncho-
pulmonaires

Directeurs de thèse : Monsieur LE MARECHAL Cédric, Professeur, CHRU Brest, Laboratoire de génétique moléculaire et d'histocompatibilité

Madame PACAULT Mathilde, Docteur, CHRU Brest, Laboratoire de génétique moléculaire et d'histocompatibilité

Présidente du jury : Madame CREVEAUX Isabelle, Professeure, UFR de Médecine et des Professions paramédicales de Clermont-Ferrand

Membre du jury : Madame VERONESE Lauren, Maître de conférence, UFR de Médecine et des professions paramédicales de Clermont-Ferrand

UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE
UFR DE MÉDECINE ET DES PROFESSIONS PARAMÉDICALES

THÈSE D'EXERCICE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

par

CORRE, Gauthier

Présentée et soutenue publiquement le 28 avril 2023

Analyse de performances analytiques pour la détection non invasive
des mutations activatrices et des mécanismes de résistance dans les cancers broncho-
pulmonaires

Directeurs de thèse : Monsieur LE MARECHAL Cédric, Professeur, CHRU Brest, Laboratoire de génétique moléculaire et d'histocompatibilité

Madame PACAULT Mathilde, Docteur, CHRU Brest, Laboratoire de génétique moléculaire et d'histocompatibilité

Présidente du jury : Madame CREVEAUX Isabelle, Professeure, UFR de Médecine et des Professions paramédicales de Clermont-Ferrand

Membre du jury : Madame VERONESE Lauren, Maître de conférence, UFR de Médecine et des professions paramédicales de Clermont-Ferrand



UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

PRESIDENTS HONORAIRES
UNIVERSITE D'AUVERGNE

: **JOYON** Louis
: **DOLY** Michel
: **TURPIN** Dominique
: **VEYRE** Annie
: **DULBECCO** Philippe
: **ESCHALIER** Alain

PRESIDENTS HONORAIRES
UNIVERSITE BLAISE PASCAL

: **CABANES** Pierre
: **FONTAINE** Jacques
: **BOUTIN** Christian
: **MONTEIL** Jean-Marc
: **ODOUARD** Albert
: **LAVIGNOTTE** Nadine

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
PREMIERE VICE-PRESIDENTE
CHARGEE DU PILOTAGE ET DES MOYENS
VICE PRESIDENTE CHARGEE DE LA FORMATION
VICE-PRESIDENTE CHARGEE DE LA RECHERCHE
DIRECTEUR GENERAL DES SERVICES

: **BERNARD** Mathias

: **FOGLI** Anne
: **PEYRARD** Françoise
: **PREVOT** Vanessa
: **PAQUIS** François



UFR DE MEDECINE ET DES PROFESSIONS PARAMEDICALES

DOYENS HONORAIRES

: **DETEIX** Patrice
: **CHAZAL** Jean

DOYEN-DIRECTEUR
DIRECTRICE ADMINISTRATIVE

: **CLAVELOU** Pierre
: **ROBERT** Gaëlle

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. BACIN Franck - BEGUE René-Jean - BEYTOUT Jean - BOIRE Jean-Yves - BOITEUX Jean-Paul - BOMMELAER Gilles - BOUCHER Daniel - BUSSIÈRE Jean-Louis - CANO Noël - CASSAGNES Jean - CATILINA Pierre - CHAMOIX Alain - CHAZAL Jean - CHIPPONI Jacques - CHOLLET Philippe - CITRON Bernard - CLEMENT Gilles - DASTUGUE Bernard - DAUPLAT Jacques - DECHELOTTE Pierre - DEMEOCQ François - DE RIBEROLLES Charles - DETEIX Patrice - ESCANDE Georges - Mme FONCK Yvette - M. GENTOU Claude - Mme GLANDDIER Phyllis - MM. IRTMUM Bernard - JACQUETIN Bernard - LAVERAN Henri - LESOURD Bruno - LEVAI Jean-Paul - MAGE Gérard - MICHEL Jean-Luc - MONDIE Jean-Michel - PHILIPPE Pierre - PLANCHE Roger - PONSONNAILLE Jean - Mme RIGAL Danièle - MM. ROZAN Raymond - SCHOEFFLER Pierre - SIROT Jacques - RIBAL Jean-Pierre - SOUTEYRAND Pierre - TANGUY Alain - TERVER Sylvain - THIEBLOT Philippe - TOURNILHAC Michel - VANNEUVILLE Guy - VIALLET Jean-François - Mme VEYRE Annie

PROFESSEURS EMERITES :

MM. AUMAITRE Olivier - AVAN Paul - BAZIN Jean-Etienne - CAILLAUD Denis - DAPOIGNY Michel - DUBRAY Claude - DURIF Franck - ESCHALIER Alain - KEMENY Jean-Louis - LABBE André - Mme LAFEUILLE Hélène - MM. LEMERY Didier - LUSSON Jean-René - POULY Jean-Luc

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. VAGO Philippe	Histologie-Embryologie Cytogénétique
M. BOYER Louis	Radiologie et Imagerie Médicale option Clinique
M. CANIS Michel	Gynécologie-Obstétrique
Mme PENAULT-LLOORCA Frédérique	Anatomie et Cytologie Pathologiques
M. BIGNON Yves Jean	Cancérologie option Biologique
M. BOIRIE Yves	Nutrition Humaine
M. CLAVELOU Pierre	Neurologie
M. GILAIN Laurent	O.R.L.
M. LEMAIRE Jean-Jacques	Neurochirurgie
M. CAMILLERI Lionel	Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire
M. LLOORCA Pierre-Michel	Psychiatrie d'Adultes
M. PEZET Denis	Chirurgie Digestive
M. SOUWEINE Bertrand	Réanimation Médicale
M. BOISGARD Stéphane	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
Mme DUCLOS Martine	Physiologie
M. SCHMIDT Jeannot	Médecine d'Urgence
M. BERGER Marc	Hématologie
M. GARCIER Jean-Marc	Anatomie-Radiologie et Imagerie Médicale

M. SOUBRIER Martin	Rhumatologie
M. ABERGEL Armando	Hépatologie
Mme BARTHELEMY Isabelle	Chirurgie Maxillo-Faciale
M. RUIVARD Marc	Médecine Interne
Mme JALENQUES Isabelle	Psychiatrie d'Adultes
M. MOM Thierry	Oto-Rhino-Laryngologie
M. COUDEYRE Emmanuel	Médecine Physique et de Réadaptation
M. D'INCAN Michel	Dermatologie -Vénérologie
M. GERBAUD Laurent	Epidémiologie, Economie de la Santé et Prévention
Mme PICKERING Gisèle	Pharmacologie Clinique
M. SAPIN-DEFOUR Vincent	Biochimie et Biologie Moléculaire

1ère CLASSE

M. VERRELLE Pierre	Radiothérapie option Clinique
M. TAUVERON Igor	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
M. RICHARD Ruddy	Physiologie
M. BAY Jacques-Olivier	Cancérologie
Mme GODFRAIND Catherine	Anatomie et Cytologie Pathologiques
M. LAURICHESSE Henri	Maladies Infectieuses et Tropicales
M. TOURNILHAC Olivier	Hématologie
M. CHIAMBARETTA Frédéric	Ophthalmologie
M. FILAIRE Marc	Anatomie – Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire
M. GALLOT Denis	Gynécologie-Obstétrique
M. GUY Laurent	Urologie
M. TRAORE Ousmane	Hygiène Hospitalière
M. ANDRE Marc	Médecine Interne
M. BONNET Richard	Bactériologie, Virologie
M. CACHIN Florent	Biophysique et Médecine Nucléaire
M. COSTES Frédéric	Physiologie
M. FUTIER Emmanuel	Anesthésiologie-Réanimation
Mme HENG Anne-Elisabeth	Néphrologie
M. MOTREFF Pascal	Cardiologie
M. RABISCHONG Benoît	Gynécologie Obstétrique
M. CHABROT Pascal	Radiologie et Imagerie Médicale
M. DESCAMPS Stéphane	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique
Mme HENQUELL Cécile	Bactériologie Virologie
M. POMEL Christophe	Cancérologie – Chirurgie Générale
M. THAVEAU Fabien	Chirurgie Vasculaire
M. BROUSSE Georges	Psychiatrie Adultes/Addictologie
Mme BRUGNON Florence	Biologie et Médecine du Développement et de la Reproduction
M. BUC Emmanuel	Chirurgie Digestive
M. TCHIRKOV Andréï	Cytologie et Histologie

2ème CLASSE

Mme CREVEAUX Isabelle	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. FAICT Thierry	Médecine Légale et Droit de la Santé
Mme KANOLD LASTAWIECKA Justyna	Pédiatrie

M. CORNELIS François	Génétique
M. LESENS Olivier	Maladies Infectieuses et Tropicales
M. AUTHIER Nicolas	Pharmacologie Médicale
M. LAUTRETTE Alexandre	Néphrologie Réanimation Médicale
M. ESCHALIER Romain	Cardiologie
M. MERLIN Etienne	Pédiatrie
Mme TOURNADRE Anne	Rhumatologie
M. DURANDO Xavier	Cancérologie
M. DUTHEIL Frédéric	Médecine et Santé au Travail
Mme FANTINI Maria Livia	Neurologie
M. SAKKA Laurent	Anatomie – Neurochirurgie
M. BOURDEL Nicolas	Gynécologie-Obstétrique
M. GUIEZE Romain	Hématologie
M. POINCLOUX Laurent	Gastroentérologie
M. SOUTEYRAND Géraud	Cardiologie
M. EVRARD Bertrand	Immunologie
M. POIRIER Philippe	Parasitologie et Mycologie
Mme PHAM DANG Nathalie	Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie
Mme SARRET Catherine	Pédiatrie
M. BOUVIER Damien	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. BUISSON Anthony	Gastroentérologie
Mme CASSAGNES Lucie	Radiologie et Imagerie Médicale
M. GAGNIERE Johan	Chirurgie Viscérale et Digestive
M. JABAUDON-GANDET Matthieu	Anesthésiologie-Réanimation et Médecine Péri-Opératoire
M. LEBRETON Aurélien	Hématologie
M. MOISSET Xavier	Neurologie
M. SAMALIN Ludovic	Psychiatrie d'Adultes
M. BIAU Julian	Radiothérapie
M. LACHAL Jonathan	Pédopsychiatrie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

1ère CLASSE

M. VORILHON Philippe	Médecine Générale
Mme LAPORTE Catherine	Médecine Générale

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

2ème CLASSE

Mme MALPUECH-BRUGERE Corinne	Nutrition Humaine
------------------------------	-------------------

PROFESSEURS ASSOCIES DES UNIVERSITES

Mme BOTTET-MAULOUBIER Anne	Médecine Générale
M. CAMBON Benoît	Médecine Générale
M. TANGUY Gilles	Médecine Générale
M. BERNARD Pierre	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

HORS CLASSE

Mme BOUTELOUP Corinne	Nutrition
Mme FOGLI Anne	Biochimie Biologie Moléculaire
Mme GOUAS Laetitia	Cytologie et Histologie, Cytogénétique
M. DELMAS Julien	Bactériologie
M. ROBIN Frédéric	Bactériologie
M. MARCEAU Geoffroy	Biochimie Biologie Moléculaire
Mme MINET-QUINARD Régine	Biochimie Biologie Moléculaire

1ère CLASSE

M. MORVAN Daniel	Biophysique et Traitement de l'Image
Mme GOUMY Carole	Cytologie et Histologie, Cytogénétique
Mme VERONESE Lauren	Cytologie et Histologie, Cytogénétique
Mme MIRAND Audrey	Bactériologie Virologie
M. OUCHCHANE Lemlih	Biostatistiques, Informatique Médicale et Technologies de Communication
M. LIBERT Frédéric	Pharmacologie Médicale
Mme COSTE Karen	Pédiatrie
Mme AUMERAN Claire	Hygiène Hospitalière
Mme NOURRISSON Céline	Parasitologie - Mycologie
Mme PONS Hanaë	Biologie et Médecine du Développement et de la Reproduction
M. COLL Guillaume	Neurochirurgie
M. GODET Thomas	Anesthésiologie-Réanimation et Médecine Péri-Opératoire

2ème CLASSE

M. MOUSTAFA Farès	Médecine d'Urgence
M. CHENAF Chouki	Pharmacologie Clinique
M. ANIORT Julien	Néphrologie
M. CLERFOND Guillaume	Cardiologie

Mme DUPUY Claire
Mme JULIAN Valérie
M. LAHAY Clément

Médecine Intensive – Réanimation
Physiologie
Gériatrie et Biologie du Vieillissement

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

1ère CLASSE

Mme VAILLANT-ROUSSEL Hélène

Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

HORS CLASSE

M. BLANCHON Loïc
M. MARCHAND Fabien
Mme VAURS-BARRIERE Catherine

Biochimie Biologie Moléculaire
Pharmacologie Médicale
Biochimie Biologie Moléculaire

CLASSE NORMALE

M. BAILLY Jean-Luc
Mme AUBEL Corinne
Mme GUILLET Christelle
M. BIDET Yannick
M. DALMASSO Guillaume
M. PIZON Frank
M. SOLER Cédric
M. GIRAUDET Fabrice
M. LOLIGNIER Stéphane
Mme MARTEIL Gaëlle
M. PINEL Alexandre
Mme MONIER Florie
Mme POLICARD Florence

Bactériologie Virologie
Oncologie Moléculaire
Nutrition Humaine
Oncogénétique
Bactériologie
Santé Publique
Biochimie Biologie Moléculaire
Biophysique et Traitement de l'Image
Neurosciences – Neuropharmacologie
Biologie de la Reproduction
Nutrition Humaine
Psychologie
Sciences Infirmières

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DES UNIVERSITES

Mme ESCHALIER Bénédicte
Mme RICHARD Amélie

Médecine Générale
Médecine Générale

M. TESSIERES Frédéric
Mme ROUGE Laure
Mme BERTRAND-JARROUSSE Véronique
Mme VICARD-OLAGNE Mathilde
M. MENINI Thibault

Médecine Générale
Médecine Générale
Médecine Générale
Médecine Générale
Médecine Générale

Remerciements

Aux membres du jury,

Madame la Professeure Isabelle CREVEAUX

Vous me faites l'honneur de présider ce jury, et je vous en remercie sincèrement. Je tiens également à vous exprimer toute ma gratitude pour votre soutien. Soyez assurée de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Cédric LE MARECHAL

Vous me faites l'honneur de faire partie de ce jury et je vous suis sincèrement reconnaissant pour m'avoir proposé et confié ce travail. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre écoute. Soyez assuré de mon profond respect.

Madame le docteur Lauren VERONESE

Vous me faites l'honneur de faire partie de ce jury, et je vous en remercie sincèrement. Soyez assurée de mon profond respect.

Madame le docteur Mathilde PACAULT

Je te remercie pour ton accompagnement, ton aide précieuse et tes conseils pour le travail de thèse mais aussi pour la technique.

Aux collègues,

A Emmanuelle et Sandrine pour leur gentillesse et leur patience quand il a fallu m'encadrer.

Au professeur Damien Bouvier, aux docteurs Aurore Douge, Patrick Merle et Céline Bourgne pour leur aide inestimable dans ce travail.

Aux docteurs Grégory EGEA et Stéphane KEMENY pour ce stage à GenBio qui m'a beaucoup appris, et pour m'avoir laissé du temps pour finaliser ce travail.

A Laetitia, Mathilde (pour ce saut de ligne) et Alexia ainsi qu'à tous les techniciens du laboratoire de génétique de GenBio pour leur disponibilité et leur bonne humeur.

A tous les internes et les chefs qui m'ont aidé, parfois inspiré et avec qui j'ai bien rigolé que ce soit en biologie, en médecine interne, en biologie ou aux urgences.

Merci aux proches,

A mes parents et mes frères et sœurs.

A mes quatre parents adoptifs Pauline, Clara, Florent et Marc pour avoir empêché petit biquet de se noyer, pour ces quelques verres, ces courses et ces matches.

A Camille pour avoir été la dernière à me côtoyer stéthoscope à la main et pour ces fabuleuses gardes aux urgences avec la meilleure cheffe.

A ma partenaire de souffrance Elisa, spécialiste du 200 mètres, aussi rapide que son ombre, pour ces courses qui permettent de se changer les idées et de battre des records.

A tous mes co-internes qui m'ont aidé à un moment donné sans forcément le savoir, parfois juste en écoutant mes bêtises, parmi lesquels Emeline, Ariane, Vincent (que je laisse gagner

au badminton depuis toutes ces années), William, Claudel, Jeanne, Maxime, Issam, Bouziane et bien sûr Samy.

A Katia qui préfère se déchirer un muscle plutôt que de perdre face à moi en match officiel.

Aux collègues nantais qui m'ont notamment initié à l'art subtil et ésotérique du babyfoot (la bonne parole a été diffusée jusqu'en Auvergne, quitte à créer quelques monstres au passage) et que j'aurais aimé embêter plus longtemps.

A Pauline de Plougastel pour m'avoir toujours aidé, hébergé et écouté.

A Clélia.

A tous ceux que j'ai oublié.

Et à sa demande, merci au docteur Antoine Pouzet.

Table des matières

1	Introduction.....	18
1.1	Cancer broncho-pulmonaire	18
1.1.1	Définition et épidémiologie	18
1.1.2	Diagnostic et prise en charge.....	20
1.1.3	Mutations activatrices	24
1.1.3.1	<i>KRAS</i>	28
1.1.3.2	<i>EGFR</i>	29
1.1.3.3	<i>ALK</i>	31
1.1.4	Mécanismes de résistance.....	32
1.1.5	Thérapies ciblées	36
1.1.5.1	Généralités	36
1.1.5.2	<i>EGFR</i>	38
1.1.5.3	<i>ALK</i>	40
1.1.5.4	<i>ROS1</i>	42
1.1.5.5	<i>KRAS</i>	42
1.1.5.6	Autres	42
1.1.5.7	Surveillance et monitoring.....	44
1.1.5.8	Tests compagnons	44
1.2	ADN libre circulant	46
1.2.1	Applications médicales	47
1.2.2	Fraction d'ADN tumoral circulant	49
1.2.3	Développement : profil de méthylation, fragmentomique, topologie	51
1.2.4	Limites	55
1.3	Objectifs.....	58

2	Matériels et méthodes	59
2.1	Sélection des patients	59
2.2	Prélèvement et extraction d'ADN	60
2.3	NGS Ion Torrent Ampliseq.....	60
2.4	qPCR SensiScreen.....	62
2.5	PCR digitale	63
2.5.1	Principe	63
2.5.2	Amorces et sondes d'hydrolyse	64
2.5.3	Technique	64
2.6	Analyse des données.....	66
2.6.1	Détection qualitative des variants	66
2.6.2	Analyse statistique.....	67
3	Résultats.....	68
3.1	Cohorte de patients	68
3.2	PCR SensiScreen.....	69
3.3	PCR digitale	70
3.3.1	LOB, LOD et linéarité.....	70
3.3.2	Concordance et fréquence allélique	71
3.3.3	Sensibilité clinique	72
4	Discussion	73
5	Conclusion	80
6	Références bibliographiques	82
7	Annexes.....	90

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

TABLEAUX

Tableau I : 8^e classification TNM du cancer du poumon tirée du référentiel Auvergne Rhône Alpes en oncologie thoracique

Tableau II : Classification par stade tirée du référentiel Auvergne Rhône Alpes en oncologie thoracique

Tableau III : Panel minimal de gènes pour les CBNPC de stade avancé

Tableau IV : Détails des amorces et des sondes d'hydrolyse des différents essais

Tableau V : Caractéristiques cliniques et biologiques des patients inclus

Tableau VI : Limites de blanc et limites de détection des différents essais

Tableau VII : Ratio muté/non muté pour chaque mutation selon les techniques NGS Ion Torrent Ampliseq et ddPCR

Tableau VIII : Médianes des fréquences alléliques (VAF) retrouvées pour les échantillons positifs par technique NGS Ion Torrent Ampliseq et par ddPCR et coefficient de corrélation de Spearman

Tableau IX : Résultats de l'analyse par ddPCR pour les échantillons issus de patients porteurs d'une mutation au niveau intra tumoral

FIGURES

Figure 1 : Répartition des mutations activatrices dans les adénocarcinomes métastatiques

Figure 2 : Localisation des mutations activatrices les plus fréquentes d'*EGFR*

Figure 3 : Représentation des principaux mécanismes de résistance aux ITK anti *EGFR* à un niveau cellulaire

Figure 4 : Stratégie de prise en charge par ITK des patients avec un CBNPC muté *EGFR*

Figure 5 : Applications potentielles de l'ADN libre circulant dans la prise en charge des cancers

Figure 6 : Spectre des caractéristiques épigénétiques identifiées sur les molécules d'ADN libre circulant

Figure 7 : Design des sondes d'hydrolyse pour la détection en PCR digitale de la mutation *EGFR* L858R et des délétions de l'exon 19

Figure 8 : Exemples de résultats de PCR digitale selon deux designs différents

Figure 9 : Résultats obtenus par qPCR SensiScreen pour 4 échantillons

Figure 10 : Titration des différentes mutations en ddPCR

LISTE DES ABREVIATIONS

ADK : Adénocarcinome

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ALK : Anaplastic Lymphoma Kinase

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Adénosine Triphosphate

ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

CBNPC : Cancer Bronchique Non à Petites Cellules

CBPC : Cancer Bronchique à Petites Cellules

cfDNA : cell-free DNA

cffDNA : cell-free fetal DNA

Ct : Cycle treshold

ctDNA : circulating tumor DNA

EGFR : Epithelial Growth Factor Receptor

FDA : Food and Drug Administration

FFPE : Formalin-Fixed Paraffin-Embedded

HAS : Haute Autorité de Santé

INCa : Institut National du Cancer

ITK : Inhibiteur de Tyrosine Kinase

KRAS : Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog

LOB : Limit Of Blank

LOD : Limit Of Detection

NGS : Next Generation Sequencing

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDL-1 : Programmed Death Ligand 1

ddPCR : digital droplet PCR

qPCR : quantitative PCR

RCP : Réunion de Concertation Pluridisciplinaire

RTK : Récepteur Tyrosine Kinase

VAF : Variant Allele Frequency

WT : Wild Type

1 Introduction

1.1 Cancer broncho-pulmonaire

1.1.1 Définition et épidémiologie

Le cancer est une pathologie définie par la prolifération non régulée de cellules « anormales » avec accumulation d'anomalies génétiques et échappement aux systèmes de réparation de l'Acide Désoxyribonucléique (ADN). Le cancer du poumon, aussi appelé cancer bronchique primitif ou cancer bronchopulmonaire, correspond aux tumeurs malignes se développant à partir des cellules épithéliales bronchiques. Il s'agit du deuxième cancer le plus diagnostiqué dans le monde avec 2.21 millions de cas en 2020 et de la première cause de mortalité par cancer dans le monde (première cause chez les hommes, deuxième chez les femmes après le cancer du sein) avec près de 1.8 millions de morts en 2020 selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (1). En France le cancer est la première cause de mortalité ; le cancer du poumon est le troisième cancer le plus fréquent, avec plus de 46 300 nouveaux cas diagnostiqués en 2018 selon l'Institut National du Cancer (INCa) pour 33 117 décès estimés, là aussi au premier rang de la mortalité par cancer (2). Le diagnostic se fait fréquemment à un stade avancé de la maladie, 40 à 55 % des diagnostics de cancers sont faits au stade IV avec extension métastatique, à un âge médian de 66 ans (67 ans chez l'homme, 65 ans chez la femme). On compte environ deux hommes pour une femme, mais chez l'homme l'incidence reste globalement stable depuis 40 ans quand elle est en forte progression chez les femmes, autour de 5 % supplémentaires par an entre 2010 et 2018. La mortalité suit la même tendance avec une diminution chez les hommes de 1.6 % en moyenne et une augmentation chez les femmes de 3 % en moyenne par an entre 1990 et 2018, toujours selon l'INCa. Ces évolutions sont principalement liées au tabagisme, principal

facteur de risque de cancer pulmonaire, qui augmente chez les femmes. Le tabagisme est associé à un risque relatif de cancer entre 10 et 15 par rapport au risque des non-fumeurs (définis comme les personnes ayant fumé moins de 100 cigarettes dans leur vie). Il est responsable de 8 cancers du poumon sur 10 avec une corrélation entre l'incidence du cancer bronchique et l'importance de la consommation tabagique selon les pays (3). Cependant la part de cancers bronchiques survenant chez des patients non-fumeurs est en progression. Ceux-ci sont plus souvent des adénocarcinomes (ADK) et surviennent préférentiellement chez les femmes avec une estimation entre 10 à 25 % des cas dans les pays occidentaux, pouvant monter jusqu'à plus de 50 % des cas chez les femmes en Asie du Sud-Est (4,5). Chez ces patients le développement du cancer est lié à des altérations génétiques activatrices spécifiques, comme dans le gène Epithelial Growth Factor Receptor (*EGFR*) qui est le plus fréquemment muté dans ce contexte. On retrouve néanmoins d'autres facteurs de risque : le tabagisme passif, les expositions professionnelles comme l'amiante, l'arsenic ou les rayonnements ; les expositions environnementales avec le radon ou la pollution atmosphérique liée particulièrement au gaz d'échappement ; de mauvaises habitudes diététiques (faible consommation de fruits et légumes, forte consommation de viande) et des pathologies pulmonaires sous-jacentes (bronchopneumopathie chronique obstructive, emphysème, fibrose pulmonaire). Il existe également des formes familiales de cancer, avec notamment le syndrome de Li-Fraumeni qui est un syndrome génétique rare de susceptibilité à de nombreux cancers, dont l'adénocarcinome pulmonaire, associé à des variants pathogènes dans le gène suppresseur de tumeur *TP53*. La majorité des adénocarcinomes pulmonaires associés au syndrome de Li-Fraumeni sont par ailleurs porteurs de mutations somatiques activatrices, principalement dans *EGFR* (6). Une susceptibilité génétique constitutionnelle au cancer pulmonaire est aussi associée à certains

loci comprenant des gènes impliqués dans la cancérogénèse, la réparation de l'ADN ou la réponse inflammatoire. Il a été notamment identifié des régions en 5p15 avec le gène *TERT* codant la transcriptase inverse de la télomérase, surexprimé dans les cellules cancéreuses. Le locus 15q25 contient lui des gènes codant des récepteurs cholinergiques à la nicotine, pouvant en cas de variants être responsable d'une sensibilité et d'une addiction accrue au tabac chez des patients fumeurs (3).

1.1.2 Diagnostic et prise en charge

Le diagnostic du cancer pulmonaire repose sur l'examen anatomo-pathologique pratiqué sur des prélèvements histologiques ou cytologiques qui permettent également la réalisation d'analyses immunohistochimiques et moléculaires. Les prélèvements tissulaires sont effectués selon la localisation des lésions : par endoscopie bronchique avec idéalement cinq biopsies pour le diagnostic et cinq supplémentaires pour le phénotypage et le génotypage, ou par biopsies transthoraciques sous contrôle scanographique pour les lésions périphériques avec au minimum 2 carottes. Ils sont ensuite fixés dans le formol et inclus en paraffine (7). On distingue deux principaux types histologiques de cancers bronchiques : les cancers non à petites cellules (CBNPC), le plus fréquents avec près de 85% des cas de cancers du poumon et les cancers à petites cellules (CBPC) représentant les 15% restants.

Les CBNPC sont eux-mêmes divisés en trois sous-types : les adénocarcinomes (50 % des cancers totaux), les cancers épidermoïdes (25 %) et les carcinomes à grandes cellules (ou carcinome non à petites cellules Not Otherwise Specified (NOS)) en cas de tumeur non différenciée, non classable en adénocarcinome ou en carcinome épidermoïde. Cette distinction qui s'appuie sur l'aspect morphologique et sur l'immunohistochimie (le

T - Tumeur	Tx	Tumeur primaire non connue ou tumeur prouvée par la présence de cellules malignes dans les sécrétions broncho-pulmonaires mais non visible aux examens radiologiques et endoscopiques.
	T0	Absence de tumeur identifiable.
	Tis	Carcinome <i>in situ</i> .
	T1	Tumeur de 3 cm ou moins dans ses plus grandes dimensions, entourée par du poumon ou de la plèvre viscérale, sans évidence d'invasion plus proximale que les bronches lobaires à la bronchoscopie (c'est-à-dire pas dans les bronches souches).
	T1a(mi)	Adénocarcinome minimalement-invasif
	T1a	≤ 1cm
	T1b	> 1 cm et ≤ 2 cm
	T1c	> 2 cm et ≤ 3 cm
	T2	Tumeur de plus de 3 cm, mais de moins de 5 cm OU avec un quelconque des éléments suivants -envahissement d'une bronche souche quelle que soit sa distance par rapport à la carène mais sans envahissement de la carène, -envahissement de la plèvre viscérale, -existence d'une atélectasie ou pneumonie obstructive
	T2a	> 3 cm mais ≤ 4 cm
T2b	> 4 cm mais ≤ 5 cm	
T3	Tumeur de plus de 5 cm et de moins de 7 cm , OU associée à un(des) nodule(s) tumoral(aux) distinct(s) dans le même lobe, OU envahissant directement : -la paroi thoracique (incluant les tumeurs du sommet), -le nerf phrénique, -la plèvre pariétale ou le péricarde pariétal.	
T4	Tumeur de plus de 7 cm OU associée à des nodules tumoraux séparés dans deux lobes différents du même poumon, OU envahissant directement : -le médiastin, -le cœur ou les gros vaisseaux, -la trachée, ou la carène -le diaphragme, -le nerf récurrent, -l'œsophage, -un(des) corps vertébral(ux).	
N - Adénopathies	Nx	Envahissement locorégional inconnu.
	N0	Absence de métastase dans les ganglions lymphatiques régionaux.
	N1	Métastases ganglionnaires péri-bronchiques homolatérales et/ou hilaires homolatérales incluant une extension directe.
	N2	Métastases dans les ganglions médiastinaux homolatéraux ou dans les ganglions sous-carénaux
N3	Métastases ganglionnaires médiastinales controlatérales ou hilaires controlatérales ou scaléniques, sus-claviculaires homo- ou controlatérales.	
Métastases	M0	Pas de métastase à distance.
	M1	Existence de métastases :
	M1a	Nodule(s) tumoral(ux) séparés dans un lobe controlatéral, ou nodules pleuraux ou pleurésie maligne ou péricardite maligne
	M1b	Une seule métastase extra-thoracique dans un seul organe
M1c	Plusieurs métastases extrathoraciques dans un seul ou plusieurs organes	

Tableau I : 8^e classification TNM du cancer du poumon tirée du référentiel Auvergne Rhône

Alpes en oncologie thoracique, d'après (8).

marquage TTF1 signe l'adénocarcinome et le marquage P40 le cancer épidermoïde) a une importance particulière car prédictive d'une réponse à certains traitements. En effet les adénocarcinomes sont plus sujets à certaines anomalies génétiques somatiques pouvant favoriser la cancérogénèse et rendant possible l'usage de certaines thérapies ciblées améliorant la survie et la qualité de vie.

Les CBPC sont des tumeurs neuroendocrines dont le diagnostic repose sur l'histologie complétée par l'immunohistochimie : TTF1 est positif ainsi qu'un ou plusieurs marqueurs neuroendocrines que sont la chromogranine, la synaptophysine et CD56 qui ne sont à rechercher qu'en cas de morphologie faisant évoquer une tumeur neuroendocrine. Mais environ 10 % des CBPC ont des marqueurs neuroendocrines négatifs et/ou un marquage TTF1 négatif.

Il existe d'autres types de tumeurs neuroendocrines pulmonaires plus rares avec les tumeurs carcinoïdes, tumeurs bien différenciées de bas grade ou de grade intermédiaire, et les carcinomes neuroendocrines à grandes cellules qui sont de haut grade de malignité tout comme les CBPC.

Après un bilan d'extension par imagerie, le cancer est classé grâce à la classification TNM, selon sa taille, sa localisation et la présence d'adénopathies ou de métastases (Tableaux I et II). La classification est d'abord clinique (cTNM) puis l'histologie définit la classification pathologique (pTN). En plus de l'examen anatomopathologique, une analyse immunohistochimique de l'expression de la protéine Programmed Death Ligand 1 (PDL-1), qui constitue un point de contrôle du système immunitaire, par les cellules tumorales doit être systématique pour les CBNPC de stade IIIA non résécables à IV dès le diagnostic initial. Il s'agit d'un biomarqueur théranostique prédictif de la réponse aux immunothérapies.

	N0	N1	N2	N3	M1a-b Tout N	M1c Tout N
T1a	IA-1	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T1b	IA-2	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T1c	IA-3	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T3	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	IV-A	IV-B
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC	IV-A	IV-B

Tableau II : Classification par stade tirée du référentiel Auvergne Rhône Alpes en oncologie thoracique, d'après (9).

La stratégie thérapeutique curative du cancer du poumon repose sur plusieurs modalités de traitement : la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'immunothérapie et les thérapies ciblées. Il existe différents types de thérapies ciblées, le plus fréquent dans le cancer pulmonaire est l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK). L'anatomo-pathologie, indispensable au diagnostic, guide également la prise en charge thérapeutique qui diffère selon le type histologique.

Pour les CPNPC l'exérèse chirurgicale complète avec curage ganglionnaire est le traitement de référence plus ou moins associé à une chimiothérapie adjuvante pour les stades pII et pIII. Pour les stades pI il n'y a pas de traitement systémique post opératoire en dehors d'un éventuel traitement adjuvant par osimertinib (ITK anti EGFR de 3^e génération) en cas de mutation *EGFR* L858R ou de délétion dans l'exon 19 (Del19). En cas de cancer inopérable, généralement à partir de cancers classés cN2, le traitement fait appel à une association de chimio-radiothérapie concomitante suivie d'une immunothérapie adjuvante (Durvalumab, Anticorps monoclonal bloquant l'interaction PDL-1 et PD-1) si l'état du patient le permet. Pour les cancers métastatiques (stade IV) la présence d'une mutation somatique de l'*EGFR*, de *ALK* (Anaplastic Lymphoma Kinase) ou de *ROS1* est une indication de traitement par thérapie ciblée avec un inhibiteur de l'EGFR de 3^e génération (osimertinib) quel que soit le statut PDL-1, ou un inhibiteur de ALK/ROS1 (alectinib, crizotinib). Si la mise en évidence d'une telle mutation est faite au cours d'une première ligne de chimiothérapie et/ou d'immunothérapie, il est recommandé de poursuivre ces traitements comme prévu et d'utiliser la thérapie ciblée en traitement d'entretien ou en traitement de 2nde ligne en cas de progression de la maladie. Un traitement en monothérapie par anticorps anti PD-1 (Pembrolizumab) est sinon possible en cas d'expression de PDL-1 par plus de 50 % des cellules tumorales en immunohistochimie. La présence d'une mutation activatrice dans

EGFR, *ALK* ou *ROS1* rend l'utilisation d'une immunothérapie délétère, même en cas de forte expression de PDL-1, ce qui impose de vérifier leur absence avant de débiter une immunothérapie. En cas de traitement systémique à introduire en urgence avec un statut moléculaire inconnu, il est recommandé d'utiliser des schémas de chimiothérapie seule, sans immunothérapie, notamment chez les non-fumeurs. En dehors de ces situations la prise en charge se fait par chimiothérapie à base de platine pouvant être associée à une immunothérapie par pembrolizumab, quel que soit le niveau de PDL-1, pour les CBNPC épidermoïdes comme non épidermoïdes. L'association chimiothérapie et bévacicumab, un anticorps monoclonal anti VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), est indiquée uniquement pour les carcinomes non épidermoïdes et est à poursuivre jusqu'à progression ou toxicité. Lors de rechute le traitement de deuxième intention comprend l'immunothérapie par un anti-PD-1 ou un anti PDL-1 si elle n'a pas déjà été utilisée ou une nouvelle ligne de chimiothérapie sans immunothérapie dans le cas contraire.

Les CBPC sont exceptionnellement opérables, leur traitement dépend du stade de la maladie : les formes limitées sont traitées par l'association chimio-radiothérapie concomitante avec irradiation cérébrale prophylactique en cas de réponse complète. Les formes diffuses bénéficient d'un traitement palliatif basé sur la chimiothérapie associée à l'immunothérapie (atézolizumab ou durvalumab), peu de patients présentant une survie supérieure à 3 ans. En cas de rechute le traitement de deuxième ligne sera une chimiothérapie selon l'état du patient et la lurbinectédine, un inhibiteur de la transcription induisant une apoptose cellulaire par cassure de l'ADN, est disponible en autorisation d'accès compassionnel depuis 2020.

Les cancers pulmonaires sont les tumeurs solides les plus pourvoyeuses de métastases cérébrales qui grèvent fortement le pronostic. L'incidence de ces métastases cérébrales est d'environ 15 % au diagnostic initial dans les CBNPC avec une fréquence plus importante pour les adénocarcinomes par rapport aux carcinomes épidermoïdes (10) et encore plus en cas de mutation *EGFR* (au-delà de 20 %) (11) ou *ALK* (jusqu'à 38 %) (12). Au cours de leur suivi, 40 à 50 % des adénocarcinomes vont évoluer avec des métastases cérébrales qui ce qui représente jusqu'à 70 % pour les tumeurs porteuses de mutation activatrice (13). Leur prise en charge, lorsque l'exérèse chirurgicale n'est pas possible, repose sur un traitement systémique adapté à l'histologie PDL-1 et identique aux CBNPC stade IV avec en plus la réalisation d'une radiothérapie stéréotaxique cérébrale d'emblée ou secondaire en cas de progression. En cas de mutation *EGFR* associée, l'osimertinib qui est déjà indiqué en 1^{ère} ligne dans les cas sans métastases cérébrales reste efficace sur les localisations cérébrales.

1.1.3 Mutations activatrices

Les cancers sont aussi classés selon les altérations moléculaires dont ils sont porteurs, dont certaines peuvent initier et maintenir la cancérogénèse, on parle de mutations pilotes (« driver »), conductrices ou activatrices. Ces mutations génétiques peuvent avoir un intérêt théranostique et/ou pronostique grâce au développement récent de thérapies ciblant certaines protéines.

Il y a plus de 40 ans a été mis en évidence le rôle des protéines tyrosine kinases en tant qu'oncogènes dans des tumeurs animales induites par des rétrovirus. Il faudra attendre 1996 et le développement de l'imatinib (14), un inhibiteur de la protéine tyrosine kinase BCR-ABL, dans les leucémies myéloïdes chroniques pour confirmer l'implication de ces

enzymes en cancérologie humaine et lancer véritablement le développement des thérapies ciblées pour le traitement des cancers (15). Le génome humain contient environ 90 gènes tyrosine kinases à l'origine de protéines tyrosine kinases. Ces protéines sont des enzymes catalysant la réaction de transfert d'un groupement phosphate de l'adénosine triphosphate vers le résidu tyrosine d'une protéine cible impliquée dans de multiples voies de signalisation et jouant donc le rôle de régulateurs de nombreuses fonctions cellulaires critiques telle la croissance, la prolifération, la survie, la différenciation, la mobilité et la mort cellulaire. Il existe deux classes principales de protéines tyrosine kinases : les récepteurs tyrosine kinases (RTK) transmembranaires, avec un site de liaison extracellulaire et un domaine kinase catalytique intracellulaire, permettent la transduction intracytoplasmique d'un signal émanant du niveau extracellulaire ; alors que d'autres protéines tyrosine kinases intracellulaires, localisées au niveau du cytosol, du noyau ou à la face interne de la membrane plasmique, contribuent à la diffusion du signal. Les protéines tyrosine kinases sont maintenues dans un état inactif sous forme monomérique par différents mécanismes d'inhibition jusqu'à ce que leur ligand se fixe sur le domaine extracellulaire ou jusqu'à la perte de signaux inhibiteurs provenant d'autres voies intracellulaires, entraînant l'activation de l'enzyme via son oligomérisation et la phosphorylation du résidu tyrosine du substrat (16).

Les protéines tyrosine kinases sont régulées à de nombreux niveaux et la dérégulation de leur activité liée des anomalies génétiques acquises confère des capacités accrues de survie, de prolifération et de résistance médicamenteuse aux cellules, favorisant la survenue et l'évolution de cancer. Un mécanisme de dérégulation fréquemment retrouvé, notamment dans les cancers hématologiques suite à une translocation chromosomique, est une protéine de fusion (hybride) associant les domaines d'une protéine tyrosine kinase

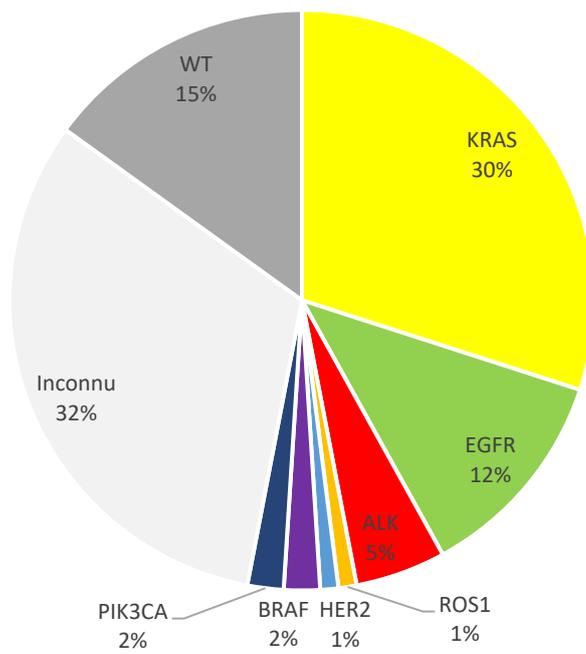


Figure 1 : Répartition des mutations activatrices dans les adénocarcinomes métastatiques, d'après (22).

récepteur ou non avec une autre protéine entraînant son oligomérisation permanente et donc son activation en l'absence de ligand ou de signal physiologique d'activation. C'est le cas du transcrite de fusion BCR-ABL retrouvé dans les leucémies myéloïdes chroniques où l'activité tyrosine kinase d'ABL est dérégulée du fait de l'absence de domaines responsables de l'auto-inhibition de la kinase associée à la présence de domaines apportés par BCR responsables d'une auto-activation (16,17). Un second mécanisme important est dû à la dérégulation d'une protéine tyrosine kinase en lien avec les mutations survenant dans son gène. Elles entraînent un changement conformationnel de la protéine, déstabilisant sa forme inactive et permettant sa dimérisation indépendamment de la liaison de son ligand, ce qui active la voie de signalisation en aval. Cela concerne notamment le gène *EGFR* avec de petites délétions en phase ou des mutations ponctuelles qui augmentent en plus la sensibilité du récepteur à son ligand (18). Un dernier mécanisme de dérégulation est lié à l'expression majorée ou aberrante d'un récepteur tyrosine kinase, de son ligand, des deux en même temps ou au contraire à la diminution de l'activité de facteurs limitants l'activité tyrosine kinase. C'est le cas de la surexpression du récepteur tyrosine kinase ErbB2 (HER2/neu) dans le cancer du sein qui favorise la croissance cellulaire.

Les altérations somatiques les plus fréquemment décrites dans les adénocarcinomes bronchiques métastatiques sont les mutations de *KRAS* (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma oncogene homolog) dans 30 % des cas. Elles sont mutuellement exclusives avec les mutations de l'*EGFR* retrouvées dans 10 à 15 % des cas dans la population caucasienne (jusqu'à 50 % des cas en Asie) avec une fréquence trois fois plus importante chez les non-fumeurs et chez les femmes (19,20). Les translocations de *ALK* ont une fréquence proche de 5 % avec là aussi une association plus importante avec l'absence de tabagisme et le genre féminin mais sans impact de l'origine ethnique. On retrouve à des fréquences plus faibles

des translocations de *ROS1* (1 à 2 %), des mutations de *BRAF* (2 %), de *PIK3CA* (2 %) et de *HER2* (1 %), des sauts de l'exon 14 du gène *MET* (1 à 2 %), des translocations de *RET* (1 à 2 %) et des gènes *NTRK1, 2* et *3* (< 1 %) (21,22) (figure 1).

Les mutations activatrices de ces gènes sont beaucoup moins fréquentes dans les carcinomes neuroendocrines pulmonaires avec seulement quelques cas de réarrangement d'*EGFR* dans les CBPC (23) qui se caractérisent plutôt au niveau génomique par une inactivation des gènes *TP53* et *RB1*, des gènes suppresseurs de tumeur, et par des mutations dans des gènes de régulation de la transcription comme *CREBBP*, *EP300* et *MLL* (24). Les carcinomes neuroendocrines à cellules géantes peuvent présenter un génotype hétérogène, soit proche des CBPC (altérations bialléliques de *TP53* et *RB1*) soit plus proche des autres carcinomes non neuroendocrines (altérations bialléliques de *TP53*, *STK11* et *KEAP1*, avec peu de translocations *ALK*, *RET*, *ROS1* et moins de 1 % de mutation *EGFR*) (25). Tout comme les tumeurs carcinoïdes qui possèdent des mutations particulières, ils ne seront pas abordés car de fréquences rares et sans indications de thérapie ciblées associées à ces altérations actuellement.

La recherche de ces anomalies génétiques somatiques concerne donc principalement les CBNPC et est indiquée dans différents cas :

- Au diagnostic des stades métastatiques de CBNPC non épidermoïdes et des cancers épidermoïdes chez le non-fumeur : avant le traitement de première ligne (*EGFR*, *ALK*, *ROS1*), lors du traitement de première ligne et avant de débiter celui de seconde ligne (*KRAS*, *BRAF* et plus ou moins *RET*), lors du traitement de seconde ligne et plus (*HER2*, *MET*, *RET*, *NTRK*, *NRG1*).

	Adjuv.	Avant L1	A L1 / Avant L2	A L2 et plus
PDL1	IIIA-B	IHC		
EGFR	Ib-IIIA	Non-épi		
KRAS				
BRAF				
HER2				
MET ex14				
Autres MET				
ALK		IHC/Non-épi		
ROS1		Non-épi		
RET				
NTRK				
NRG1				<i>si dispo</i>
RB1		IHC / TNE		
STK11		TNE		
TP53		TNE		
KEAP1		TNE		

Légende

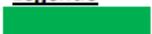
	A rechercher
	En option
IHC	Immuno-Histochimie
TNE	Tumeur Neuro-endocrine (hors CBPC)
Non-épi	Non-épidermoïdes

Tableau III : Panel minimal de gènes pour les CBNPC de stade avancé, tiré de (26).

- Chez les non-fumeurs qui présentent une fréquence plus importante d'altérations ciblables.
- Pour tous les carcinomes non épidermoïdes opérés de stade pIB à pIII (*EGFR*).

Cette recherche d'altérations moléculaires doit être réalisée dans les trois semaines suivant la biopsie (26). En cas de contre-indication à la biopsie (hypoxémie sévère réfractaire, anomalies majeures de la coagulation), d'insuffisance de tissu ou de prélèvement non contributif la réalisation de biopsies liquides, bien moins invasives qu'un prélèvement tissulaire, pour analyse moléculaire sur ADN tumoral circulant (ctDNA) est souhaitable. La recherche de mutation sur ADN libre circulant (cfDNA) a un intérêt au diagnostic, lors de la mise en place d'une thérapeutique puisque le statut *EGFR*, *ALK* et *ROS1* modifie le traitement de première intention en cas de maladie métastatique. Cela permet également le suivi de la maladie notamment en cas de progression sous thérapie ciblée anti EGFR.

Pour la recherche d'altérations génétiques tumorales le référentiel AURA propose un panel minimal comprenant 10 gènes plus 4 supplémentaires spécifiques aux tumeurs neuroendocrines (Tableau III).

1.1.3.1 *KRAS*

Le gène *KRAS* est un des premiers oncogènes identifiés et un gène clé dans la cancérogénèse car le plus souvent muté dans de nombreux cancers, pas uniquement pulmonaires. Situé sur le chromosome 12, il fait partie de la famille des protéines RAS, des GTPases jouant un rôle dans les voies de signalisation contrôlant la prolifération cellulaire. *KRAS* est impliqué dans un tiers des cancers, proportion montant à 50 % dans les cancers colorectaux et à 95% dans les cancers pancréatiques. Environ un tiers des CBNPC survenant chez les fumeurs

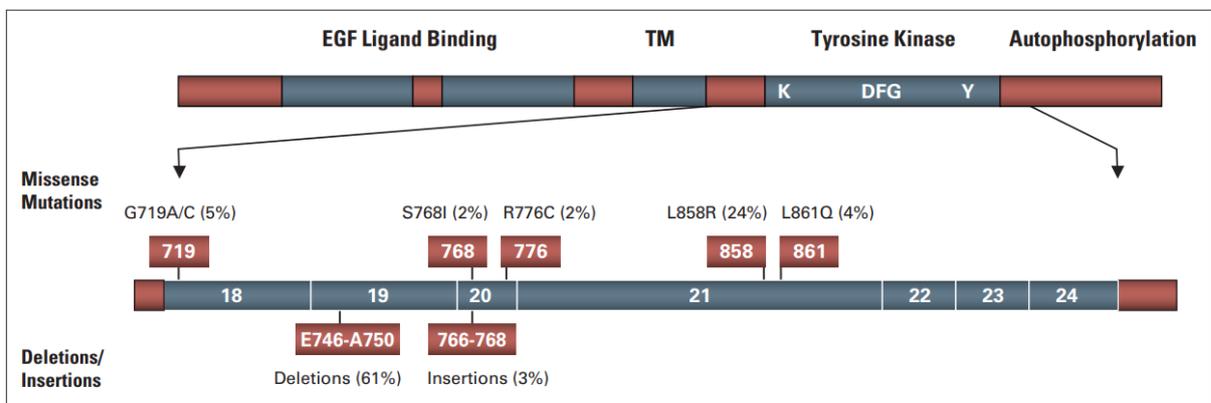


Figure 2 : Localisation des mutations activatrices les plus fréquentes d'EGFR, tiré de (29).

sont associés à une mutation de *KRAS* quand les autres oncogènes déjà cités précédemment ont une incidence bien plus faible. Il existe 9 mutations principales à l'origine de plus de 90 % des cancers induits par *KRAS* mais les plus fréquentes dans les adénocarcinomes pulmonaires sont les mutations G12C et G12V chez les fumeurs et la mutation G12D chez les non-fumeurs (27). Longtemps étudié, *KRAS* est resté sans traitement ciblé jusqu'au développement récent d'ITK efficace uniquement sur la mutation G12C comme le sotorasib.

1.1.3.2 *EGFR*

Le gène *EGFR*, localisé en 7p11.2, a été découvert en 1962 et est exprimé de façon ubiquitaire dans tous les tissus. Il code la protéine de même nom à activité tyrosine kinase qui joue un rôle clé dans de nombreuses voies de signalisation cellulaires impliquées dans la prolifération, la survie, la différenciation et la mobilité cellulaire. Il a été retrouvé surexprimé dans les CBNPC et dans des tumeurs de la sphère Oto-Rhino-Laryngologique ou colorectales avant de faire par la suite l'objet du développement d'ITK spécifiques (20). Les altérations d'*EGFR* associées à sa surexpression se retrouvent quasi exclusivement dans les adénocarcinomes et les carcinomes à grandes cellules. Quelques cas sont rapportés dans des carcinomes épidermoïdes mais seraient en fait liés à des erreurs de classification histologique (28).

Les mutations sont localisées dans le domaine tyrosine kinase du gène, comprenant les exons 18 à 21 (29) (figure 2). Les plus fréquentes sont les délétions en phase dans l'exon 19 et la mutation p.Leu858Arg dans l'exon 21 qui représentent à elles deux 85 à 95% des mutations identifiées dans *EGFR* avec un ratio d'environ 2 :1 de del19 vs L858R. Il existe d'autres altérations récurrentes mais plus rares d'*EGFR*, dont l'analyse systématique est plus

variable car moins standardisée selon les plateformes diagnostiques. Ont été décrites les mutations dans l'exon 18 E709X (E709A, E709G, E709K, E709V), G719X (G719S, G719A, G719C, G719D) et delE709_T710insD, des insertions en phase dans l'exon 19, des insertions en phase et la mutation S768I dans l'exon 20 ainsi que la mutation L861Q dans l'exon 21. Les insertions dans l'exon 20 sont plus fréquentes en Asie, dans les adénocarcinomes chez les femmes non fumeuses. Elles sont associées à un mauvais pronostic et représentent 4 à 10 % des altérations décrites dans les CBNPC. Elles regroupent de petites insertions ou duplications en phase de 3 à 21 paires de bases entre les acides aminés 762 et 774 de la protéine EGFR. Il est possible de retrouver dans certaines tumeurs deux réarrangements d'*EGFR*, soit une del19 ou la L858R associée à une mutation plus rare soit deux mutations rares, rendant difficile la détermination exacte de la fréquence de ces mutations dites rares pour lesquelles on estime une présence globale autour de 10% dans les tumeurs mutées *EGFR* (30).

La mutation *EGFR* T790M est le plus souvent acquise suite au traitement par des ITK de 1^{ère} et 2^e générations et est associée à l'échappement au traitement des tumeurs qui en sont porteuses par modification de la conformation du récepteur. L'osimertinib possède une activité spécifique contre cette isoforme du récepteur et reste efficace sur les tumeurs mutées T790M. Quelques cas de tumeurs naïves de tout traitement, présentant cette mutation et donc naturellement résistantes aux deux premières générations d'ITK ont été rapportés (31). Avec l'utilisation de l'osimertinib, de nouvelles mutations de résistance sont sélectionnées et bien qu'encore peu fréquentes, les mutations C797S principalement, mais aussi L718Q et L792X sont associées à une progression sous ITK de 3^e génération.

1.1.3.3 ALK

Le gène *ALK* a d'abord été identifié dans les lymphomes anaplasiques à grandes cellules et est muté dans de nombreux types de tumeurs. Il est localisé sur le bras court du chromosome 2 et code un récepteur tyrosine kinase de la famille des récepteurs à l'insuline. *ALK* jouerait un rôle dans le développement neuronal mais sa fonction précise n'a pas été clairement établie.

Une translocation impliquant *ALK* est à l'origine d'un gène de fusion associant la partie du gène contenant le domaine kinase avec un gène dit partenaire lui-même sous le contrôle d'un promoteur fort, ayant pour conséquence un niveau d'expression de *ALK* plus élevé que la normale. Il existe de nombreux gènes partenaires (*EML4*, echinoderm microtubule-associated protein like-4, étant le plus fréquent, mais également *KIF5*, *KLC1*, *TGF*, *PTPN3*) avec des points de cassures différents définissant des variants de fusion, mais peu de données dans la littérature sur l'impact de cette diversité génétique sur la réponse ou la résistance initiale aux ITK. Contrairement à *EGFR* où il y a un petit nombre de mutations de résistance connues, pour *ALK* il existe une diversité importante de mutations secondaires associées à une résistance aux ITK qui dépendent de la translocation initiale et de l'éventuel ITK préalablement utilisé. Il est donc important de déterminer précisément le gène de fusion et les éventuelles mutations de résistance secondaires pour adapter au mieux le traitement (32). Une technique immunohistochimique peut être suffisante pour établir le caractère altéré de *ALK*, mais il est souhaitable de confirmer la présence du réarrangement par une autre technique comme la FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), ou le séquençage de nouvelle génération (NGS) (séquençage ADN ou ARN).

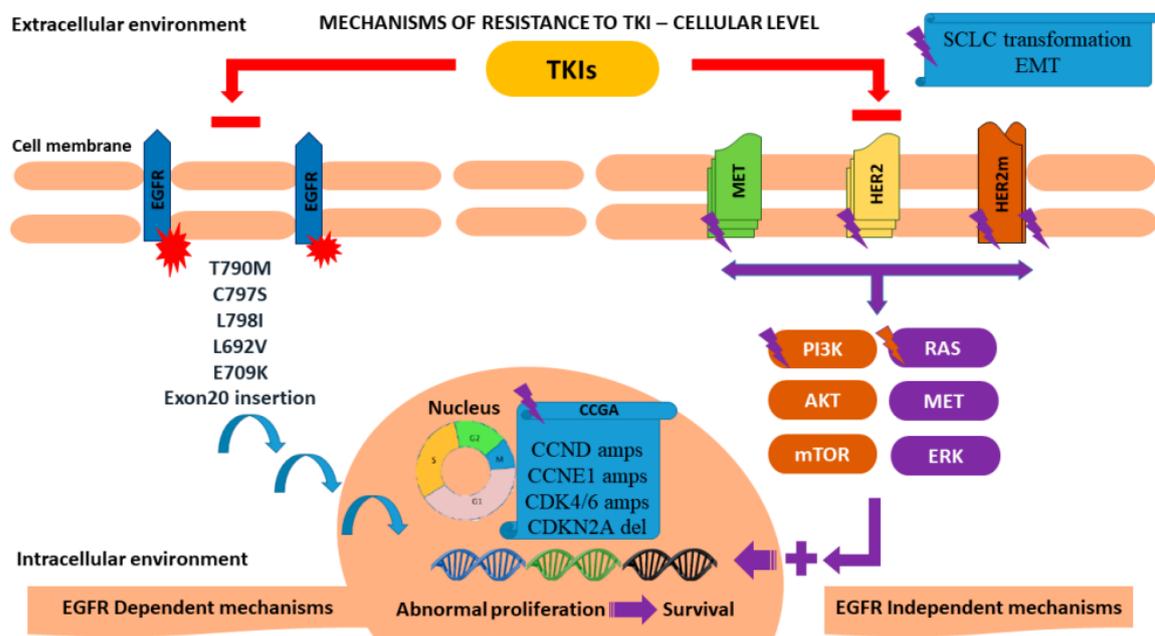


Figure 3 : Représentation des principaux mécanismes de résistance aux ITK anti EGFR à un niveau cellulaire. Etoiles et éclairs représentent des mutations, les flèches rouges un effet inhibiteur, les flèches bleues et violettes un effet activateur. CCGA: Cell Cycle Gene Alterations, SCLC: Small Cell Lung Cancer, EMT: Epithelial Mesenchymal Transformation.

Tirée de (13).

1.1.4 Mécanismes de résistance

La résistance aux ITK ciblant les différentes mutations activatrices des cancers pulmonaires non à petites cellules métastatiques est un phénomène crucial à prendre en compte dans la stratégie thérapeutique, que cette résistance soit intrinsèque ou acquise. Même si la réponse aux traitements par ITK est globalement bonne et prolongée, tous les CBNPC métastatiques mutés *EGFR* vont inévitablement acquérir un mécanisme de résistance et progresser sous traitement (33).

La résistance lorsqu'elle est liée à une mutation *de novo* ou à un mécanisme indépendant d'*EGFR* préexistant est dite intrinsèque et est alors associée à une faible réponse initiale aux ITK (20 à 30% des cas de tumeurs résistantes ou répondant moins de trois mois). Au contraire, la résistance est dite acquise lorsqu'elle est liée à une pression de sélection thérapeutique soit par l'expansion d'un sous clone tumoral pré existant génétiquement différent ou par adaptation au traitement par ITK de cellules auparavant sensibles (13). C'est l'hétérogénéité spatiale et temporelle des populations cellulaires au sein d'une même tumeur qui semble être à l'origine de la majorité des résistances observées et donc des échecs sous traitement par ITK.

Il existe différents mécanismes de résistance, que celle-ci soit intrinsèque ou acquise, ayant le potentiel de surpasser ou de contourner l'action des thérapies ciblées. Ces mécanismes peuvent être classés en deux groupes : un utilisant des voies moléculaires *EGFR* dépendantes et un autre des voies *EGFR* indépendantes (Figure 3). Nous allons aborder les mécanismes de résistance *EGFR* dépendant regroupant toutes les mutations dans *EGFR* à l'origine d'une moindre activité des ITK.

Les insertions en phase de l'exon 20 sont des mutations de novo responsables de résistance primaire à la majorité des ITK anti *EGFR*. Dans les mutations *EGFR* del19 ou L858R on observe une réduction de l'affinité de la liaison de l'ATP (Adénosine Triphosphate) par rapport à l'*EGFR* sauvage, en faveur des inhibiteurs d'*EGFR* compétitifs de l'ATP. Du fait d'altérations structurelles spécifiques, cette modification de l'affinité de l'ATP n'est pas retrouvée dans le cas de ces insertions de l'exon 20, et explique leur résistance primaire aux ITK via un encombrement stérique et une conformation de l'*EGFR* constamment activée (34). Différents traitements sont en cours de développement pour passer outre cette résistance intrinsèque liée aux insertions de l'exon 20 comme l'amivantamab, un anticorps bi spécifique de *MET* et *EGFR*, ou le mobocertinib, un ITK irréversible ciblant *EGFR* et *HER2*.

La mutation secondaire T790M localisée dans l'exon 20 d'*EGFR* est un facteur majeur de résistance aux ITK de 1^{ère} et 2^e générations retrouvé dans plus de 50 % des tumeurs après traitement et à l'origine de survie sans progression plus courte chez les patients traités avec ces ITK. La présence de la mutation T790M rend le site de liaison de l'ATP au niveau de la portion intracellulaire de la protéine *EGFR* insensible aux ITK de premières générations avec une affinité pour l'ATP restaurée à un niveau presque équivalent à celui de la protéine sauvage. De plus la méthionine 790 est à l'origine d'un encombrement stérique limitant la capacité des ITK de premières générations à se lier au site de liaison de l'ATP. Paradoxalement les patients chez qui la mutation T790M persiste après progression ont une meilleure réponse par rapport à ceux chez qui la mutation est perdue avec persistance de la mutation initiale d'*EGFR* (15,2 mois contre 6,1 mois). Des résultats similaires ont été observés lors du traitement par osimertinib, en cas de mutation acquise T790M avec une meilleure survie sans progression en cas de persistance de cette dernière (9,3 mois contre 7,8 en cas de perte) ou en cas de mécanisme de résistance *EGFR* dépendant (13,5 mois

contre 8,2 mois en cas de mécanisme indépendant) (13). Il semblerait que la perte de la mutation T790M soit associée avec le développement de mécanisme de résistance *EGFR* indépendant menant à une résistance aux ITK de seconde ligne dont l'osimertinib. Il n'a jamais été rapporté de mutation T790M après progression sous traitement par osimertinib qui est l'ITK recommandé en première intention pour les tumeurs mutées *EGFR*.

La mutation C797S est une mutation tertiaire située dans l'exon 20 qui diminue la capacité de l'osimertinib (et d'autres ITK comme le rociletinib, l'olmutinib et le narzatinib) à se lier sur la protéine EGFR. C'est le mécanisme de résistance à l'osimertinib *EGFR* dépendant le plus fréquent, retrouvé dans 26 % des cas de progression traités par osimertinib en seconde ligne et chez 7 % des patients traités par osimertinib en première ligne. La coexistence de mutation C797S et T790M rendrait possible l'utilisation combinée d'ITK de 1^{ère} et de 3^e génération selon le statut en cis ou en trans de ces mutations (35). L'association de géfitinib et d'osimertinib semble efficace notamment sur la combinaison del19/C797S associée en trans à une del19/T790M. Au contraire la triple association del19, T790M et C797S en cis reste résistante aux trois générations d'ITK, combinées entre elles ou non. Une évolution clonale avec le passage de la mutation C797S de trans à cis est un potentiel mécanisme de résistance à l'association erlotinib et osimertinib. En cas de progression sous ITK de 3^e génération un nouveau prélèvement pourrait avoir un intérêt pour déterminer ce statut en trans ou en cis de la mutation C797S. Actuellement des ITK de 4^e génération sont en cours de développement pour couvrir la résistance acquise liée à la mutation *EGFR* C797S.

D'autres mutations rares de résistance à l'inhibition d'EGFR par les ITK ont été mises en évidence avec une fréquence estimée en 1 à 8 % des cas, souvent dans des profils moléculaires complexes. Les mutations L718Q et L792X sont notamment responsables de

2 % et 3 % des cas respectivement de progression sous osimertinib, là aussi par altération de la liaison de l'osimertinib à son site cible. Ces mutations peuvent être associées à d'autres mutations *EGFR*, notamment en cis avec la T790M. Le géfitinib semble rester efficace sur les mutations L792X, quand à la mutation L718Q elle reste sensible aux 1^{ère} et 2^e générations d'ITK en l'absence de mutation T790M associée.

Les mécanismes de résistance *EGFR* indépendants, qui ne sont pas spécifiques au CBNPC, comprennent différentes voies agissant seule ou en association avec d'autres mécanismes *EGFR* dépendants ou non. Parmi ceux-ci on retrouve l'amplification de *MET*, un proto-oncogène codant un RTK impliqué dans la prolifération, la survie et la migration cellulaire. Son amplification est responsable de l'activation de plusieurs voies de signalisation (mitogen-activated protein kinase-MAPK, signal transduction and activator of transcription-STAT, phosphatidylinositol 3 kinase-PI3K Akt) physiologiquement activées par *EGFR* dans le contexte de CBNPC. Ainsi malgré l'inhibition pharmacologique d'*EGFR*, ces voies de signalisation favorisant la carcinogénèse restent activées. Il s'agit du mécanisme de résistance à l'osimertinib le plus fréquent (15 %) qui est associé à un mauvais pronostic. Actuellement le capmatinib et le crizotinib font partie des options thérapeutiques les plus efficaces dans ce contexte. Le gène *HER2* qui code ErbB2, un RTK de la famille d'*EGFR* régulant l'activation de plusieurs voies oncogéniques (extracellular signal regulated kinase – ERK, MAPK et PI3K Akt) dans le contexte de CBNPC, peut être également amplifié ou sujet aux mutations ponctuelles (90 % d'insertions dans l'exon 20 de *HER2*). Ces amplification et mutations sont responsables de 2 à 5 % et de 1.5 % des résistances acquises à l'osimertinib respectivement. Bien que les traitements restent limités pour les amplifications de *HER2*, de nombreuses molécules sont à l'essai pour les mutations ponctuelles, notamment des associations à base de trastuzumab.

Parmi les autres mécanismes de résistance *EGFR* indépendants on retrouve l'altération de la voie RAS-MAPK permettant la médiation de signal à la croissance et la division cellulaire, des mutations ou amplification de *PIK3CA* impliqué dans la voie de signalisation PI3K, des altérations des gènes régulateurs du cycle cellulaire, une transition épithélio-mésenchymateuse ou encore l'évolution du type histologique d'un CBNPC vers un CBPC (4 à 15 % des cas de résistance aux TKI en première ligne).

La fréquence de ces mécanismes diffère si la résistance fait suite à un traitement de première ou de seconde ligne, avec notamment l'amplification de *MET* plus commune en cas de résistance à un premier traitement quand la mutation C797S est plus souvent décrite lors de résistance à un traitement de seconde intention (13).

La présence de métastases cérébrales est un facteur de résistance supplémentaire pour les patients traités par ITK de 1^{ère} et 2^e génération du fait de l'incapacité de ces médicaments à passer la barrière hémato-encéphalique. La dernière génération d'ITK anti *EGFR*, avec l'osimertinib, résout ce problème grâce à une bonne diffusion cérébrale.

1.1.5 Thérapies ciblées

1.1.5.1 Généralités

Le cancer bronchopulmonaire est classé parmi les cancers de plus mauvais pronostic avec une survie globale à 5 ans qui reste mauvaise, autour de 20 % (18 % pour les hommes et 24 % pour les femmes) selon la Haute Autorité de Santé (HAS). Le développement des thérapies ciblées a amélioré la survie pour les CBNPC, qui est passée chez l'homme de 26 à 35 % entre 2001 et 2014, et chez la femme de 35 à 44% sur la même période (INCa). Le terme de thérapie ciblée désigne les traitements n'ayant de bénéfice que chez certains patients

préalablement identifiés par un marqueur prédictif qui aura été évalué par un test compagnon (36). Ces thérapies, à la différence des chimiothérapies conventionnelles agissant sans discrimination sur les cellules à division rapide, sont dirigés spécifiquement contre des cibles moléculaires impliquées dans les voies de signalisation intracellulaire participant à la transformation maligne des cellules. Ces cibles sont principalement localisées sur les cellules tumorales et cette plus grande spécificité d'action permet de limiter les effets secondaires indésirables comparativement aux chimiothérapies. Parmi les différentes approches de thérapies ciblées celle qui nous intéresse dans le contexte du cancer pulmonaire est celle des inhibiteurs de protéine kinase et plus particulièrement les inhibiteurs de tyrosine kinases. Les ITK en se fixant de manière compétitive sur les sites de liaisons de l'ATP présents sur le RTK bloquent l'activation des sites tyrosine kinases, la phosphorylation et donc la signalisation cellulaire en aval. L'inhibition de la cascade de signalisation liée à EGFR par les ITK entraîne l'apoptose rapide des cellules porteuses de l'altération, de plus dans les tumeurs solides les ITK induisent également une inhibition de l'angiogenèse et de la diffusion métastatique.

Dans les CBNPC la recherche de mutations somatiques associées à des thérapies ciblées est maintenant la norme. La mise en évidence de mutations de l'*EGFR* et de translocations de *ALK* (37) et de *ROS1* (38) sont des prérequis pour déterminer la sensibilité ou non de la tumeur aux inhibiteurs de tyrosine kinase. En cas de progression des lésions sous traitements par ITK anti EGFR ou anti ALK une recherche de mutation de résistance à ces traitements doit être faite sur une nouvelle biopsie tissulaire ou liquide. Les premiers ITK développés dans le cancer bronchique, l'erlotinib et le gefitinib, sont des anilinoquinazolines fonctionnant par inhibition compétitive au niveau du site de liaison de l'ATP par l'EGFR. Ils ont été approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) en 2004 pour les CBNPC mutés

EGFR localement avancés ou métastatiques réfractaires après au moins une ligne de chimiothérapie et ont obtenu l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en France dans la même indication en 2005 et 2009 respectivement. Depuis, de nombreux nouveaux ITK ont été testés dans différentes indications selon le gène muté et selon le type de réarrangement de ce gène, comme pour *EGFR*.

1.1.5.2 EGFR

Il existe différentes d'ITK anti EGFR, actuellement l'osimertinib est plus efficace que le géfitinib ou l'erlotinib. De plus il présente un meilleur coefficient de diffusion intra cérébrale que les ITK de 1^{ère} et 2^e génération (39). En 2016 une AMM conditionnelle est mise en place pour l'osimertinib dans le traitement des CBNPC localement avancé ou métastatique avec mutation *EGFR* T790M. Cette AMM devient pleine et entière en 2017 et l'indication est étendue au traitement de 1^{ère} ligne des CBNPC localement avancés ou métastatiques avec mutations activatrices *EGFR* L858R et Del19 en 2018. En mai 2021, à la suite de l'essai ADAURA publié en 2020 pour lequel les données de survie globale ne sont pas encore disponibles, l'Osimertinib est également indiqué pour le traitement adjuvant après résection tumorale complète chez les patients de stades pIB à pIIIA en cas de mutation *EGFR* L858R ou Del19. Son utilisation pendant 3 ans après chimiothérapie adjuvante si celle-ci est indiquée et réalisable montre un bénéfice pour la survie sans maladie. Tous les ITK, de la 1^{ère} à la 3^e génération semblent montrer de meilleurs résultats en cas de délétions dans l'exon 19 qu'en cas de mutation L858R (11,40).

Les mutations de l'*EGFR* par insertions dans l'exon 20 sont généralement résistantes aux ITK habituels, et l'inclusion dans des essais cliniques est à privilégier en 1^{ère} intention. Des

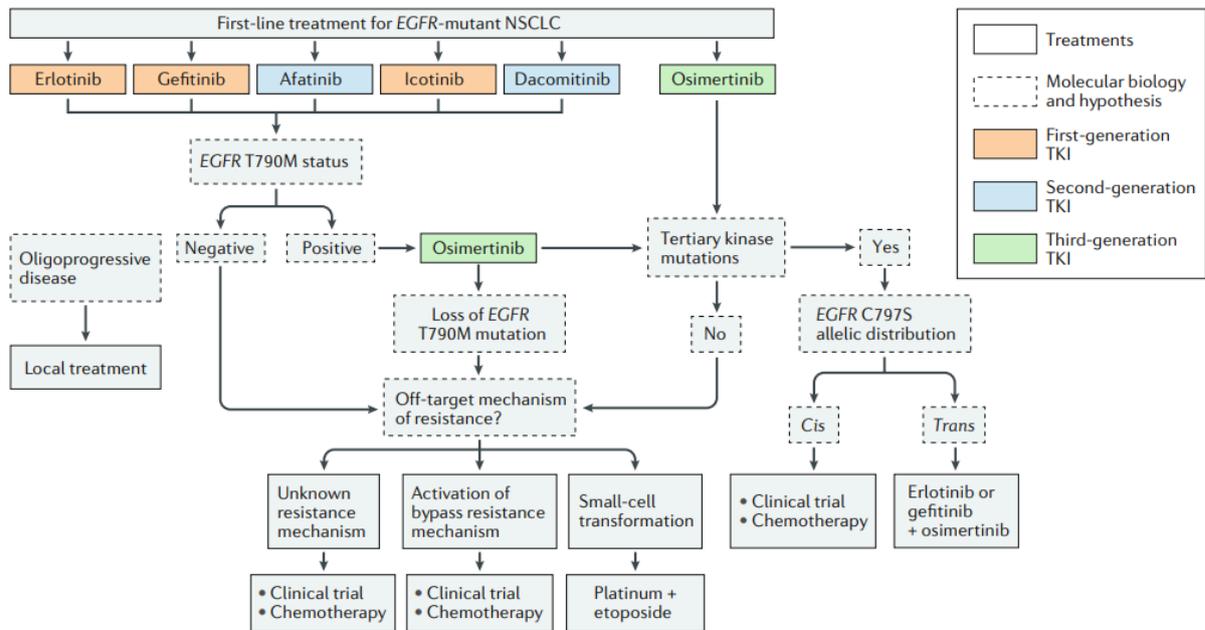


Figure 4 : Stratégie de prise en charge par ITK des patients avec un CBNPC muté EGFR, tirée de (35).

inhibiteurs spécifiques sont en cours de développement comme le Mobocertinib (41) qui a reçu une autorisation d'utilisation par la FDA aux Etats-Unis en 2021, et qui bénéficie pour l'instant en France d'une Autorisation d'Accès Compassionnel en cas de progression sous chimiothérapie tout comme le poziotinib.

Il y a peu de données concernant la sensibilité des tumeurs porteuses de mutations rares d'*EGFR* (hors insertion de l'exon 20) aux ITK (30) et leur présence doit conduire à discuter la prise en charge en Réunion de Concertation Pluridisciplinaire (RCP). Les cancers avec mutations G719X ou S768I présentent une meilleure réponse s'ils sont traités par chimiothérapie plutôt que par ITK de 1^{ère} et 2^e générations, sauf en cas de mutation L858R associée où un traitement par ITK apporte une meilleure survie globale (42). Une autre étude de 2020 montre de bons résultats pour l'osimertinib en termes de réponse et de survie dans les CBNPC avec mutations rares d'*EGFR* (43).

Il n'y a pas d'indication à traiter par ITK un patient en l'absence de mutation activatrice ou si le statut mutationnel n'est pas connu.

En cas de progression après traitement par un ITK de première ou deuxième génération, qui ne sont plus indiqués actuellement en première ligne, un nouveau prélèvement sanguin ou tissulaire doit être réalisé pour rechercher une mutation de résistance (figure 4). La présence de la mutation T790M doit entraîner un traitement de seconde ligne par osimertinib s'il n'a pas été utilisé en 1^{ère} ligne. En l'absence de mise en évidence de mutation T790M, l'osimertinib n'est pas indiqué et c'est une chimiothérapie qui doit être proposée, selon les mêmes règles qu'une première ligne chez les patients non mutés. En cas de détection d'un autre mécanisme moléculaire de résistance l'inclusion dans un essai clinique peut être proposée.

En deuxième ligne après un traitement initial par osimertinib, là aussi un prélèvement à la recherche d'un mécanisme de résistance ciblable doit être effectué. Il existe des associations d'anticorps monoclonaux en cours d'évaluation dans ces situations et l'inclusion dans des essais cliniques doit être privilégié. L'association d'ITK de première et de 3^e génération n'est pas recommandée en pratique en France. En l'absence de mécanisme ciblable, le traitement repose sur la chimiothérapie, à base de sels de platine, en l'absence de contre-indication.

En cas de progression cérébrale sous ITK, après évaluation de la possibilité d'un traitement local (radiothérapie cérébrale stéréotaxique ou chirurgie), la démarche est la même avec la recherche d'un mécanisme de résistance moléculaire (la recherche peut aussi être réalisée sur culot cellulaire dans le liquide céphalo-rachidien en cas de méningite carcinomateuse), la mise sous osimertinib si ce n'était pas déjà l'ITK utilisé, sa poursuite si la progression est isolée ou le passage à une chimiothérapie de 2^e ligne en cas d'absence de mécanisme moléculaire identifié. Il ne faut pas hésiter à répéter à distance les prélèvements par biopsie liquide en cas de progression sans identification de mécanisme de résistance initial.

1.1.5.3 ALK

Pour les CBNPC avancés avec réarrangement de *ALK* la prise en charge a été profondément modifiée avec le développement des thérapies ciblées anti ALK dont le premier représentant a été le crizotinib en 2012 avec une AMM conditionnelle pour le traitement de 2^e ligne, puis en traitement de 1^{ère} ligne à partir de 2017 avec une supériorité par rapport à la chimiothérapie systémique. Depuis l'obtention de leur AMM en mai 2018 et en juillet 2020 respectivement, le traitement de première ligne recommandé est l'alectinib ou le brigatinib

en monothérapie. Ils ont démontré une meilleure efficacité que le crizotinib (12,44) notamment dans le contrôle des métastases cérébrales. Le lorlatinib, un ITK anti ALK de 3^e génération présente lui aussi une meilleure survie sans progression que le crizotinib dans une analyse intermédiaire de l'étude CROWN (45) et est remboursé dans cette indication en France depuis novembre 2022. Il n'existe pas de données comparatives claires entre alectinib, brigatinib et lorlatinib permettant de les placer les uns par rapport aux autres. En cas de métastases cérébrales le traitement par un de ces trois ITK est recommandé en première intention, le traitement local sera discuté dans un second temps ou en cas d'efficacité insuffisante de l'ITK.

En cas de progression, notamment cérébrale, sous ITK de première ligne il est recommandé d'effectuer un prélèvement sanguin ou tissulaire pour déterminer le mécanisme de résistance. Les différents ITK ne présentent pas le même profil de sensibilité et le type de mutation de résistance varie selon l'ITK anti ALK utilisé en première intention. Les mutations de résistances *ALK* sont ainsi plus fréquentes avec le brigatinib, puis l'alectinib et enfin restent peu fréquentes avec le crizotinib. Le traitement par ITK est donc à adapter au profil moléculaire de résistance si celui-ci est connu. En l'absence de profil moléculaire disponible il est recommandé de passer sous alectinib s'il n'a pas déjà été utilisé. S'il y a une nouvelle progression de la maladie le brigatinib et le lorlatinib pourront être envisagés toujours selon le profil moléculaire de résistance, ainsi qu'une inclusion dans un essai clinique. En cas d'échec ou de contre-indication des ITK, le traitement repose sur une chimiothérapie avec ou sans bevacizumab.

1.1.5.4 ROS1

Pour les CBNPC avancés avec réarrangement *ROS1* le crizotinib possède l'AMM en tant que traitement de 2^e ligne depuis 2017, et une AMM non remboursée du fait d'un service médical rendu faible pour un traitement en 1^{ère} ligne. D'autres ITK comme l'entrectinib, le ceritinib ou le lorlatinib montrent une efficacité chez les patients naïfs d'ITK avec réarrangements de *ROS1*, mais ne disposent pas d'AMM dans cette indication. Devant une progression il est toujours conseillé de rechercher un mécanisme de résistance sur cfDNA ou sur biopsie tissulaire. La chimiothérapie reste une possibilité en cas de progression.

1.1.5.5 KRAS

Plusieurs inhibiteurs ont été développés pour les mutations *KRAS* G12C, notamment le sotorasib, disponible en Autorisation temporaire d'utilisation (ATU) en seconde ligne et en cas de métastases cérébrales, et l'adagrasib pour lequel il n'y a pas de données concernant les localisations cérébrales. Les patients porteurs de mutations *KRAS*, particulièrement G12C, doivent se voir proposer d'être intégrés à des essais cliniques.

1.1.5.6 Autres

Pour les autres réarrangements moins fréquents retrouvés dans les CBNPC il existe plus ou moins de thérapies ciblées disponibles selon les cas qui seront discutés en RCP, et l'inclusion des patients dans des essais thérapeutiques est toujours encouragée. L'Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique référence les différents ITK disponibles dans les CBNPC et l'évolution de leurs indications.

En cas de tumeur avancée présentant une mutation *BRAF* V600E l'association dabrafenib-trametinib est indiquée en France depuis 2017 en en seconde ligne de traitement et plus, après une chimiothérapie et/ou une immunothérapie. Le traitement par ITK en monothérapie des cancers mutés *BRAF* est à l'origine d'une résistance acquise via la voie de signalisation MEK, d'où l'utilisation actuelle d'une association avec le trametinib qui est un inhibiteur de MEK (46).

Pour les tumeurs présentant une mutation dans l'exon 14 de *MET* plusieurs ITK semblent efficaces, comme le crizotinib qui possède une Recommandation Temporaire d'Utilisation après échec d'une première ligne de traitement intraveineux. Le tepotinib, pour lequel une AMM est en attente, présente un taux de réponse global de 56 % dans l'étude VISION. Enfin le capmatinib est disponible en accès précoce en 2^e ligne.

Pour les réarrangements de *RET*, le pralsetinib est disponible en monothérapie en France en accès précoce mais uniquement après traitement par chimiothérapie à base de sels de platine.

À la suite d'une étude de 2018, regroupant 55 patients avec différentes tumeurs solides dont 4 cancers du poumon, montrant l'efficacité du larotrectinib, celui-ci est indiqué en première ligne en monothérapie pour le traitement des tumeurs solides localement avancées ou métastatiques présentant une fusion *NTRK* lorsqu'il n'existe aucune option thérapeutique satisfaisante. Le larotrectinib n'est cependant remboursé que dans les contextes pédiatriques. D'autres ITK ont été testés mais pas retenus devant un service médical rendu insuffisant et l'inclusion en essai clinique reste la seule autre alternative à privilégier.

1.1.5.7 Surveillance et monitoring

L'évaluation de la réponse aux traitements et la surveillance des CBNPC, quel que soit leur stade ou leurs caractéristiques moléculaires, visent à détecter le plus précocement tout nouveau symptôme évocateur d'une évolution tumorale ou d'un effet secondaire des thérapeutiques utilisées et reposent sur l'examen clinique et l'imagerie thoracique. Pour les CBNPC de stade IV il est recommandé, d'après les pratiques courantes car sans données de la littérature, de proposer une surveillance débutant après 8 à 9 semaines puis tous les 3 mois ou à chaque changement de ligne thérapeutique, avec une réévaluation clinique et une tomodensitométrie thoraco-abdominale injectée. Si le patient a reçu une thérapie ciblée pour une altération moléculaire ou une immunothérapie prolongée il est conseillé de réaliser également une imagerie encéphalique et ce même en l'absence d'atteinte cérébrale initiale. Après deux ans de surveillance il est possible de passer à un bilan tous les 6 mois pour les patients sous ITK ou immunothérapie.

Dans les cas de tumeurs présentant des altérations génétiques, en dehors des cas avérés de progression afin de mettre en évidence une mutation ponctuelle de résistance dans le gène cible, il n'existe actuellement aucune recommandation concernant l'utilisation des analyses sur ctDNA pour le monitoring de la maladie, le dépistage précoce des rechutes ou l'évaluation de la réponse aux traitements.

1.1.5.8 Tests compagnons

Pour permettre l'utilisation des thérapies ciblées adaptées et éviter une perte de chance chez les patients atteints d'un CBNPC mutés, la détection de ces altérations génétiques et leur caractérisation est primordiale et nécessite la mise au point et l'évaluation de tests dits

compagnons. Un test compagnon est un test diagnostique permettant d'identifier les patients susceptibles d'avoir un bénéfice d'une thérapie ciblée grâce à la mise en évidence d'un marqueur prédictif, d'où le terme de test compagnon d'utilisation de l'administration d'un traitement.

Dans notre situation le marqueur est binaire et définit deux statuts : marqueur positif si présence d'une mutation activatrice et marqueur négatif en cas d'absence de mutation. Ce marqueur modifie l'effet du traitement par ITK ciblant la protéine d'intérêt et est donc prédictif de l'efficacité de la thérapie ciblée. Ce caractère prédictif lié au statut muté ou non dans les CBNPC est bien établi car associé à l'utilité clinique du test qui n'est plus à démontrer. Le gain en termes de survie sans progression, de survie globale et de qualité de vie chez les patients mutés traités par ITK a été plusieurs fois démontré et au contraire il n'y a pas d'intérêt prouvé à traiter les patients non mutés (47).

Le test diagnostique permettant d'évaluer le statut mutationnel des patients doit être validé à trois niveaux. D'abord l'évaluation de la validité analytique du test, c'est-à-dire sa capacité in vitro à réaliser la mesure d'intérêt avec exactitude et fiabilité, qui passe par l'étude de la sensibilité et la spécificité analytique, la reproductibilité et la robustesse. Ensuite la validité clinique du test qui correspond à son aptitude à prédire avec précision et fiabilité le phénotype clinique d'intérêt et qui inclut les performances diagnostiques du test (sensibilité et spécificité cliniques, valeurs prédictives positive et négative). Enfin, l'utilité clinique du test, qui a déjà été abordée, et qui correspond à son aptitude à améliorer le devenir des patients et à apporter une valeur ajoutée en termes d'optimisation de la stratégie thérapeutique. Ces tests de mise en évidence de mutation activatrice ou de résistance ont une rentabilité clinique majeure pour les adénocarcinomes pulmonaires, type histologique

le plus fréquent du cancer le plus meurtrier dans le monde. Nous nous intéressons ici aux tests sur biopsies liquides avec analyse de l'ADN tumoral circulant, qui comme déjà évoqué précédemment, permettent une détection précoce tout en étant moins invasives, donc répétibles et moins coûteuses que les biopsies tissulaires.

1.2 ADN libre circulant

La plupart des fluides corporels comme le sang, le liquide céphalo-rachidien, l'urine ou encore l'ascite transportent constamment des quantités variables de fragments d'ADN libre circulant (cell-free DNA) d'origines diverses du fait d'un relargage par toutes les cellules saines ou non lors de l'apoptose et de la nécrose cellulaire. Le cfDNA a été découvert dans le plasma humain à la fin des années 40 (48, 49), mais il faudra attendre 1989 pour que soit mis en évidence chez des patients atteints de cancer une fraction d'ADN libre issue de cellules tumorales (circulating tumor DNA) avec une signature génétique spécifique de la tumeur (50). Par la suite la présence d'ADN foetal libre circulant (cell-free fetal DNA) dans le sang maternel sera observée en 1997 avec l'identification de séquences spécifiques du chromosome Y dans le plasma de femmes enceintes de foetus masculins (51). Cet ADN libre, accessible via des prélèvements peu invasifs comme une prise de sang, constitue un réservoir d'informations reflétant en temps réel le métagénome que représente le corps humain. Ces informations génétiques sont exploitables à des fins diagnostiques, pronostiques et théranostiques dans de nombreuses pathologies comme les tumeurs solides, les anomalies génétiques fœtales et le rejet de transplantation d'organe.

1.2.1 Applications médicales

Actuellement il existe trois principales applications à l'analyse de cfDNA sur biopsie liquide : la détection de cffDNA dans le plasma maternel pour le diagnostic des aneuploïdies, le suivi de la maladie résiduelle par détection du chimérisme des ADN du donneur et receveurs dans le plasma de patients avec greffe de moelle et la détection de ctDNA chez les patients atteints de cancers.

Après la mise en évidence d'ADN d'origine fœtale dans la circulation maternelle, le cfDNA connaîtra une première application médicale pour le diagnostic prénatal (DPN) avec le développement du génotype Rhésus D fœtal non invasif qui sera mis en place en routine en 2001 en Grande-Bretagne (52). Par la suite, différentes observations comme la détection de trisomie 18 par ratio allélique épigénétique vont permettre le développement de tests prénataux non invasifs menant à la mise en place en routine de la détection des aneuploïdies fœtales en 2011. Actuellement le cfDNA est couramment utilisé dans le cadre du DPN non invasif pour la détermination du sexe fœtal, du statut rhésus D fœtal, le dépistage des aneuploïdies fœtales, le diagnostic de maladie monogénique et permet de réduire le nombre de prélèvement invasif par amniocentèse.

La greffe de moelle est un autre domaine qui bénéficie du développement de méthodes ciblant le cfDNA avec le monitoring post transplantation, la mise en évidence de maladies du greffon et de rejet d'organe. La caractérisation de polymorphismes d'un seul nucléotide permet en effet la différenciation entre ADN du donneur et ADN du receveur ainsi que la quantification de ce dernier qui participe au monitoring du greffon. La réémergence de cfDNA du receveur est un marqueur plus sensible et plus précoce que la biopsie pour les rejets aigus et pourrait permettre une adaptation du traitement immunosuppresseur pour

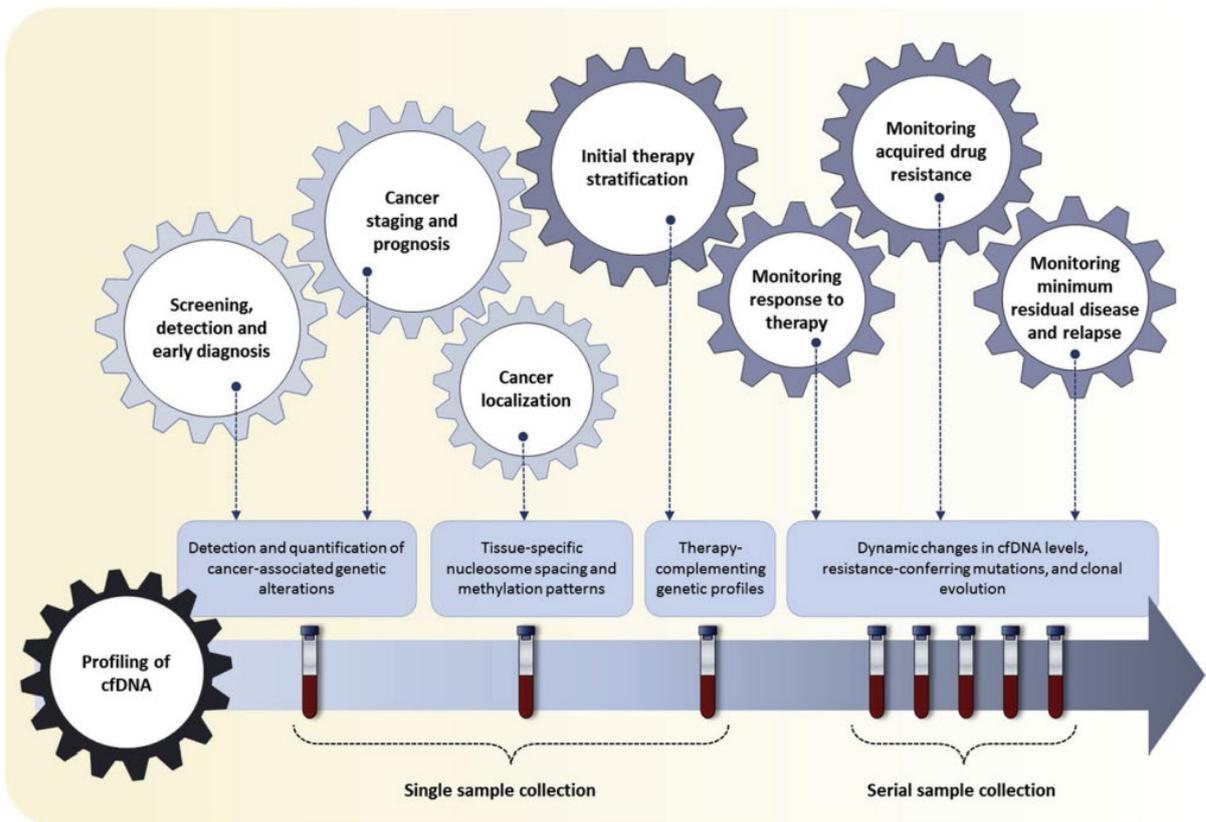


Figure 5 : Applications potentielles de l'ADN libre circulant dans la prise en charge des cancers, tirée de (54).

tous types de patients transplantés. Le cfDNA est aussi à l'étude pour le monitoring des rejets aigus dans le cadre de transplantation d'organes solides où l'augmentation du cfDNA issu du donneur dans le plasma du receveur signe une souffrance du greffon (53).

En cancérologie, l'information génétique apportée par le cfDNA, notamment sa dimension temporelle, associée au développement de technologies ultrasensibles comme le NGS ou la PCR digitale (ddPCR) permet son utilisation en tant que biomarqueur avec des applications potentielles pour le dépistage, le diagnostic, le pronostic, la localisation tumorale, la détermination de sensibilité à certains traitements, la réponse à ces traitements, le suivi de la maladie résiduelle, la détection de rechute et l'identification de mécanisme de résistance (figure 5) (54). Actuellement en France il existe des recommandations pour l'utilisation des analyses sur ADN circulant uniquement pour la mise en évidence au diagnostic initial de mutations activatrices en cas de contre-indication, de refus de la biopsie de la part du patient ou de prélèvement tissulaire non contributif ; et pour la recherche de mécanisme de résistance intrinsèque ou émergent en cas de progression sous traitement constatée cliniquement ou à l'imagerie lors du suivi de la maladie. Son utilisation pour la localisation tumorale en cas de primitif inconnu ou pour l'évaluation de la masse tumorale résiduelle ne se fait que dans le cadre d'essais cliniques auprès de laboratoires spécialisés.

L'apport en cancérologie du cfDNA en termes d'adaptation de la prise en charge thérapeutique et de survie des patients atteints de cancer laisse espérer le développement de cet outil comme biomarqueur dans de nombreuses autres pathologies. Des pathologies chroniques associées à des profils cfDNA aberrants comme les pathologies cardiovasculaires, auto-immunes ou neurodégénératives ou des pathologies évolutives caractérisées par des fluctuations rapides dans le temps en cas de progression telles que la

maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, les accidents vasculaires cérébraux ou les sepsis (analyse de l'ADN issu de bactérie, de virus ou de parasite) pourraient bénéficier d'une détection précoce et/ou d'un monitoring par analyse de cet ADN libre (55).

1.2.2 Fraction d'ADN tumoral circulant

La proportion d'ADN libre d'origine tumorale est un paramètre crucial pour le rendement des analyses en oncologie et peut constituer une limite lors de l'interprétation. Cette proportion dépend tout d'abord de la quantité de cfDNA plasmatique totale qui peut varier énormément in vivo d'un individu à l'autre sans que l'on puisse toujours l'expliquer et pour laquelle il n'existe pas de valeurs normales actuellement. Des niveaux faibles d'ADN libre sont détectés généralement chez les sujets sains et en dehors de facteurs pré analytiques et analytiques il a été décrit de nombreux paramètres modifiant la concentration plasmatique de cfDNA (55) :

- **Contexte médical** : la concentration de cfDNA mesurée est ainsi plus élevée chez les patients présentant certaines pathologies comme les cancers, les pathologies auto-immunes (lupus systémique, polyarthrite rhumatoïde et sclérodémie systémique), en cas de traumatismes (lésions cérébrales, brûlures), de pathologies cardiovasculaires, d'infections virales, de pathologies rénale, pulmonaire (exacerbation de bronchopneumopathie chronique obstructive, embolie pulmonaire), thyroïdienne ou de complications gestationnelles (prééclampsie, cholestase gravidique). A l'inverse, certaines pathologies sont associées à des taux plus faibles par rapport à des patients sains comme l'épilepsie sans que l'on puisse les expliquer par des dommages cellulaires ou tissulaires.

- **Traitements** : des traitements médicamenteux (corticoïdes à hautes doses) et certaines prises en charge comme la chirurgie, la radiothérapie ou l'hémodialyse seraient responsables de taux de cfDNA plus élevés que chez des patients non traités.
- **Etats physiologiques** : L'âge exerce également une influence, avec une concentration plasmatique plus élevée chez les individus âgés de plus de 60 ans en lien avec la sénescence cellulaire augmentée, l'inflammation induite par la mort cellulaire et des capacités de phagocytose et de clairance réduites. La masse adipocytaire, chez les femmes enceintes obèse notamment, est à l'origine de taux plus élevés de cfDNA compliquant le dépistage prénatal non invasif en réduisant la fraction fœtale par effet de « dilution » (56). Certaines études suggèrent que le taux de cfDNA serait influencé par le moment de la journée auquel est réalisé le prélèvement, même si l'impact du rythme circadien, de l'état post-prandial ou du taux de lipides sanguins n'est pas clairement établi (55). De la même façon, aucune différence significative basée sur le sexe n'a été mise en évidence.
- **Habitudes de vies** : l'effet de l'exercice plus ou moins intense, de l'alimentation, du tabac ou de l'alcool sur les concentrations de cfDNA a été étudié mais sans résultats clairs et sans corrélation significative (55).

Dans un contexte néoplasique, la quantité mesurée de cfDNA dépend ensuite plus spécifiquement d'autres paramètres en lien avec les caractéristiques de la pathologie tumorale. De manière générale, chez les patients atteints de cancer le niveau de cfDNA est corrélé au stade de la maladie donc à la masse tumorale et à la présence de métastases (57) mais le type de tumeur a également une importance. Les cancers hématologiques,

neuroendocrines, les carcinomes prostatiques et mammaires présentent des concentrations de cfDNA plus élevées que les tumeurs Oto-Rhino-Laryngologiques, cutanées, gynécologiques ou les CBNPC et ce sont les tumeurs du système nerveux central qui possèdent les plus faibles concentrations (58). La fraction et la quantité de ctDNA sont donc également corrélées avec le type de tumeur, le stade de la maladie mais aussi avec le sexe et l'âge des patients. Dans une étude rétrospective de 2021 portant sur plus de 12 000 échantillons de patients atteints de cancers de différents types la fraction de ctDNA avait une médiane de 2.6 % pour une moyenne de 12.2 % (58). Les hommes présentaient en moyenne une fraction d'ADN tumoral légèrement plus importante que les femmes avec en plus une diminution de la fraction et de la quantité à mesure que l'âge augmente. Cette différence significative entre les deux sexes qui n'est pas retrouvée pour les concentrations de cfDNA n'est pas expliquée et pourrait être attribuée à des mécanismes biologiques de relargage cellulaire ou à un stade de la maladie au moment du prélèvement qui diffèrent. Ces paramètres peuvent expliquer le mauvais rendement et les résultats non significatifs de certaines analyses sur biopsie liquide.

1.2.3 Développement : profil de méthylation, fragmentomique, topologie

Les recherches effectuées ces dix dernières années sur le cfDNA ont permis de découvrir de nombreuses caractéristiques physico-chimiques de cet ADN libre, ce qui a été une opportunité de l'exploiter pour développer ce biomarqueur dans de nombreuses pathologies. En plus de la mise en évidence de mutations et d'anomalies chromosomiques, la topologie de l'ADN (ADN double ou simple brin, ADN circulaire) et l'étude épigénétique de ces molécules d'ADN apportent de nombreuses informations sur leur origine cellulaire

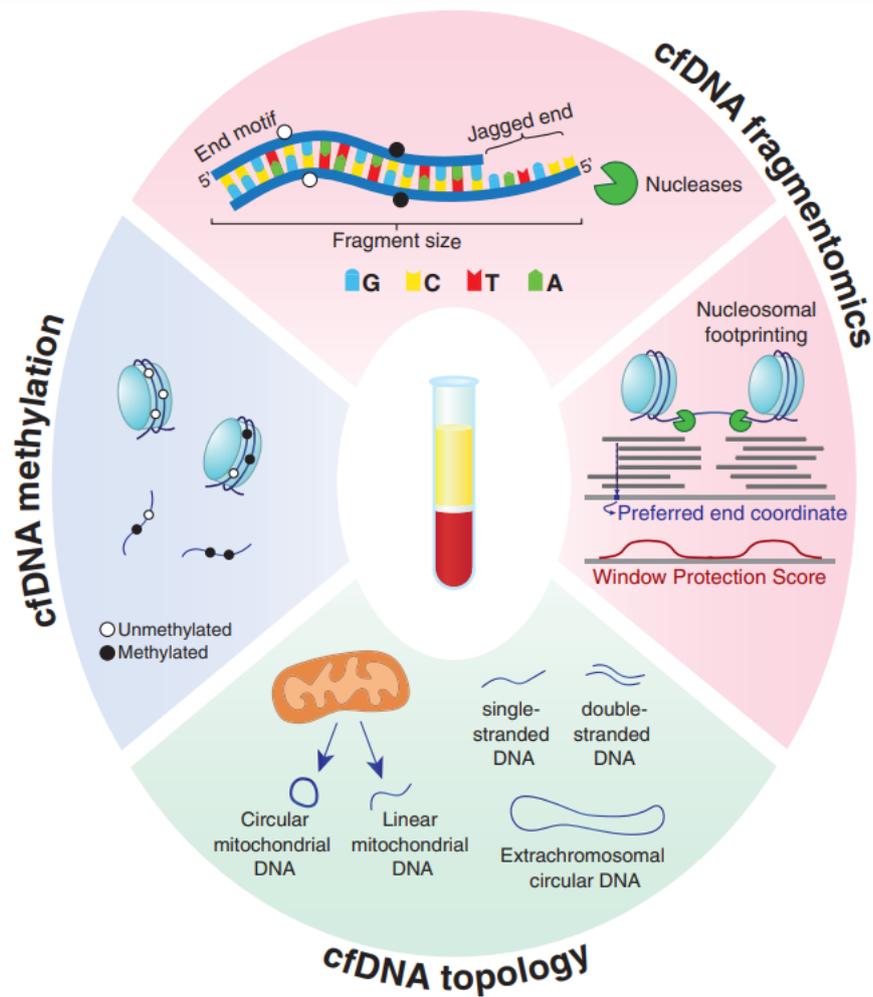


Figure 6 : Spectre des caractéristiques épigénétiques identifiées sur les molécules d'ADN libre circulant, tirée de (59).

ou tissulaire. Les caractéristiques épigénétiques cellulaires étant conservées par les molécules de cfDNA, elles rendent possible l'identification du tissu d'origine et l'estimation de la contribution des différents tissus au pool d'ADN plasmatique. Cela pourrait permettre d'identifier les tissus subissant une mort cellulaire accélérée et guider la réalisation de tests plus ciblés pour le diagnostic précoce d'un certain nombre de pathologies ou pour évaluer une réponse thérapeutique. Pour le ctDNA, ces informations rendraient possible, en plus de la mise en évidence d'une tumeur dans le cadre d'un dépistage, la localisation de cette tumeur en cas de primitif inconnu. Parmi les caractéristiques épigénétiques étudiées on retrouve le profil de méthylation et des modifications d'histone mais aussi des caractéristiques acquises secondairement par les molécules d'ADN libre comme la liaison à des protéines ou le profil fragmentomique (figure 6) (59).

La méthylation qui correspond à la présence de groupement méthyle sur le carbone 5 des cytosines de l'ADN principalement au niveau de dinucléotides CpG est responsable d'une répression transcriptionnelle par inhibition de la fixation de facteurs de transcription. Les profils de méthylation qui permettent de maintenir de manière stable certains gènes à l'état réprimé dans une population cellulaire sont conservés au cours de la réplication et sont donc spécifiques. Pour la détermination du tissu d'origine de cfDNA basée sur la méthylation une comparaison est faite avec les profils de référence des différents tissus du corps humain obtenus par whole genome bisulfite sequencing. Cette approche qui a permis d'estimer que 70 % de cfDNA plasmatique est issu des leucocytes sanguins (60) a été utilisée dans des cas de grossesse, de transplantation, de cancer, de diabète et de sclérose multiple pour identifier les différents tissus d'origine et évaluer leur contribution sans altérations spécifiques de la séquence ADN nécessairement associées. D'autres méthodes d'étude de la méthylation ont été développées, comme le séquençage après immunoprécipitation de

l'ADN méthylé (cfMeDIP-seq) qui est adapté à l'ADN déjà fragmenté et présent en faible quantité et qui permet l'identification de type de cancer sur échantillon plasmatique ou l'analyse de blocs de méthylation transmis en haplotype qui diffèrent entre tissu tumoral et non tumoral. La mise en place et l'enrichissement d'atlas de référence des profils de méthylation des types cellulaires dans des contextes pathologiques et non pathologiques est indispensable pour le développement de l'approche par méthylation. Le profil de méthylation de l'ADN foetal circulant peut ainsi servir de biomarqueur non invasif indépendamment du sexe ou du génotype du foetus pour distinguer l'ADN foetal de l'ADN maternel. L'analyse de la méthylation de l'ADN viral de l'Epstein-Barr Virus (EBV) dans le plasma humain est un exemple d'application possible. Cette analyse a révélé des profils différents selon la pathologie associée (carcinome nasopharyngé, lymphome ou infection mononucléotique) et pourrait permettre une détection précoce des cancers liés à ce virus chez des patients asymptomatiques.

La fragmentomique se définit comme l'analyse des caractéristiques des fragments d'ADN comme leur taille, leur forme, leurs motifs aux extrémités ou la localisation des points de cassure. Elle peut, comme la méthylation, servir à l'identification du type de cfDNA grâce à la distribution des fragments selon leur taille qui est en moyenne de 166 paires de bases. La fragmentation de l'ADN est un processus non aléatoire qui est liée à la structure de la chromatine, l'organisation nucléosomale et à la teneur en nucléases du tissu d'origine de l'ADN (59). Le ctDNA comprends des fragments plus courts (de 90 à 150 paires de bases) par rapport à l'ADN issu de tissus sains et une sélection sur la taille avant séquençage permet d'améliorer la détection d'ADN d'origine tumorale. Il existe des profils de fragmentation de cfDNA propres aux différents types de cancer utilisables en combinaison avec la recherche de mutations spécifiques pour augmenter la détection de ctDNA et identifier la lésion

primitive. De plus les séquences constituées des quatre dernières bases à chaque extrémité d'un fragment de cfDNA définissent des motifs qui sont eux aussi informatifs sur l'origine de l'ADN. Un score, le motif diversity score (MDS), associe certains tissus comme le foie, le placenta, le carcinome hépatocellulaire et d'autres cancers à des motifs particuliers (61) et il a été établi un catalogue génomique de motifs propres aux extrémités des fragments de patients atteints de différents cancers.

Un atout de ces marqueurs épigénétiques est qu'ils concernent une grande partie du génome et contrairement aux recherches ciblées de mutations ils permettent l'étude simultanée avec une meilleure sensibilité et spécificité de plusieurs pathologies. Par exemple la possibilité de couvrir plusieurs types de cancer pour l'identification du tissu d'origine devant une lésion primitive inconnue ou pour une détection précoce lors d'un dépistage. Il existe des exemples concrets de l'apport de ces caractéristiques épigénétiques avec une étude ayant mis en évidence sur cfDNA un profil de méthylation spécifique du cancer du sein chez des sujets asymptomatiques permettant une détection à un stade infraclinique (62) ou avec l'approbation par la FDA en 2017 du test Epi proColon pour le dépistage du cancer colorectal avec la recherche de méthylation aberrante du gène *SEPT9* (63). De nombreuses autres études n'ayant pas encore permis d'applications en pratique clinique sont en cours pour établir des corrélations entre profil épigénétique et diverses pathologies comme le cancer, les maladies cardiovasculaires ou le diabète (55). Cependant la caractérisation des profils épigénétiques de cfDNA et l'implémentation de tests ciblés ou globaux en routine avec une utilité clinique encore à valider sont freinés par plusieurs limites similaires à celles rencontrées pour l'étude des mutations génétiques sur cfDNA.

1.2.4 Limites

Malgré les progrès importants effectués dans le champ de recherche de l'ADN libre circulant ces vingt dernières années il persiste des limites biologiques, préanalytiques, techniques et analytiques au développement d'études à grande échelle et à la mise en place en routine de tests diagnostiques sur cfDNA. Une des principales limites est liée à la très faible quantité de molécules d'ADN libre circulant dans le sang, particulièrement à des phases précoces de maladie comme les cancers qui relarguent des quantités infimes d'ADN dans les fluides extracellulaires (55). Cela nécessite des méthodes adaptées avec une très bonne sensibilité analytique pour détecter les rares molécules d'ADN d'intérêt parmi toutes celles d'origines diverses présentes dans la circulation. A la faible quantité d'ADN initiale s'ajoutent des problématiques pré-analytiques avec le biais de sous échantillonnage lors de la ponction veineuse, les conditions d'acheminement et de stockage et la technique d'extraction de cet ADN circulant. Le développement de tubes dédiés à l'analyse de l'ADN circulant grâce à la stabilisation des cellules nucléées sanguines pour éviter une dilution par relargage de l'ADN leucocytaire permet une meilleure conservation des échantillons (jusqu'à 14 jours à température ambiante pour les tubes Streck Cell-free DNA BCT), mais le rendement de l'extraction de l'ADN circulant reste dépendant de la méthode utilisée et du volume plasmatique initial disponible. Le nombre important de produits et de technologies disponibles plus ou moins efficaces selon l'application ou le sous-type d'ADN circulant ciblé rend difficile une harmonisation des procédures préanalytiques.

Comme vu précédemment le taux d'ADN libre circulant mesuré est influencé par de nombreux paramètres présents dans de multiples contextes cliniques et biologiques. Toutes ces variables sont à l'origine de résultats se recoupant entre les différents types de maladies

et les individus sains, rendant difficile la détermination de valeurs normales ou d'intervalles de référence pour une condition spécifique. Bien que le niveau quantitatif de cfDNA total puisse avoir actuellement une utilité clinique limitée par rapport aux corrélations connues ou pas entre les caractéristiques qualitatives de cet ADN et diverses pathologies, ce paramètre reste informatif en oncologie. La fraction extraite d'ADN circulant d'origine tumorale peut être extrêmement faible, nécessitant le développement de tests de sensibilité adéquate, mais la mesure quantitative de ctDNA ramenée au volume de plasma de l'échantillon présente une corrélation importante avec la taille de la tumeur et pourrait être utilisée pour évaluer le stade de la maladie, pour le monitoring et pourrait également avoir une utilité pronostique pour le patient. Il persiste donc des difficultés pour la mesure précise, à la fois qualitative et quantitative, des molécules d'ADN libre circulant chez un individu malgré les progrès techniques effectués. Ces limites sont liées aux caractéristiques de l'ADN libre circulant, à savoir sa grande hétérogénéité in vivo avec de nombreux types différents et une variabilité importante dans le temps. S'ajoutent à cela l'impact potentiel de facteurs biologiques, physiques, et environnementaux, les biais possibles de préservation, de dégradation et de capture de types spécifiques d'ADN libre en lien avec les étapes pré analytiques et la mauvaise connaissance de tous ces paramètres (55).

Un autre aspect limitant est l'analyse sur biopsie liquide où seul l'ADN d'une fraction du tissu tumoral peut être capturé ne permettant pas de prendre en compte une hétérogénéité génétique spatiale au sein de la tumeur. Mais cela reste à modérer avec le fait que cet ADN tumoral est relargué dans les fluides corporels depuis toutes les localisations tumorales à la fois et fournit de ce point de vue là une meilleure image de la diversité génétique de la tumeur par rapport à une seule coupe d'une biopsie tissulaire localisée.

Au-delà de l'utilisation prometteuse en tant que biomarqueur dans de nombreuses pathologies, l'ADN libre circulant est impliqué dans d'importants processus biologiques comme l'immunité et la communication cellulaire mais aussi dans le développement, la progression tumorale ou la résistance au traitement. Toutes les fonctions biologiques de l'ADN libre circulant ne sont cependant pas encore comprises et restent peu étudiées, c'est pourquoi une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires à l'origine de ses effets potentiellement néfastes permettrait de comprendre la physiopathologie de certaines maladies et d'établir les liens entre ADN libre circulant et d'autres pathologies. De plus le manque de normes pré analytiques universelles, de recommandations pratiques et les limitations analytiques freinent le développement et la mise en œuvre de tests cliniquement pertinents (64).

L'évaluation de l'ADN libre circulant est enfin rendue plus délicate du fait de l'existence avec l'âge d'une hématopoïèse clonale à l'origine de cfDNA porteur de mutations, potentiellement spécifiques de cancer, sans pour autant signer le développement d'une lésion néoplasique. Le vieillissement est associé à l'accumulation de mutations somatiques dans virtuellement tous les tissus du fait de défaut de réparation de l'ADN pendant la réplication. L'hématopoïèse clonale correspond à l'identification dans les cellules souches hématopoïétiques de telles altérations à l'origine de populations clonales pouvant conduire au développement d'hémopathies mais également à l'origine de clones non malins sans maladies associées (65). Le relargage d'ADN libre par ces cellules hématopoïétiques peut conduire à la détection de mutations dans le cfDNA plasmatique de patients âgés entraînant une discordance (faux positifs) entre génotype de l'ADN libre circulant et génotype tumoral (66). Ce phénomène d'accumulation de mutations somatiques se retrouve chez les patients cancéreux, avant le développement de la maladie, comme chez les patients sains et il n'y a

actuellement pas de moyens clairs de différencier ces situations. Les fragments d'ADN issus de cellules tumorales sont généralement plus courts que ceux ayant une autre origine, notamment ceux en lien avec l'hématopoïèse clonale (67), mais il existe une grande variabilité de taille au sein des brins de cfDNA pouvant partager une origine commune. L'utilité de la recherche de variants somatiques chez des patients âgés à un stade infraclinique, dans le cadre d'un dépistage par exemple, est donc limitée puisque non prédictif de la suite de la prise en charge.

Finalement une analyse de l'ADN libre circulant n'aurait de valeur que si elle est positive (avec la limite de l'hématopoïèse clonale), un résultat négatif ne permettant pas de distinguer un phénomène de sous échantillonnage lors du prélèvement, d'un défaut de sensibilité de la technique en lien avec un volume d'ADN extrait faible, d'une véritable absence des mutations recherchées dans le ctDNA. Pour l'instant, en cas de résultats négatifs il est recommandé de répéter l'analyse sur cfDNA ou de la confirmer sur biopsie tissulaire (26).

1.3 Objectifs

Les mutations somatiques activatrices sont un mécanisme oncogénique fréquemment retrouvé dans les cancers broncho-pulmonaires, particulièrement dans les adénocarcinomes, chez les non-fumeurs et chez les femmes. Le cancer pulmonaire est le plus meurtrier dans le monde et en France, à un stade avancé les traitements par chimio et radiothérapie restent partiellement efficaces, mais le développement de thérapies ciblées associées à la présence d'altérations génétiques a permis d'améliorer grandement la survie et la qualité de vie des patients atteints. Leur recherche dès le diagnostic initial à visée

théranostique est désormais la norme et la sensibilité analytique des tests permettant leur détection est cruciale. Cette analyse peut être effectuée sur biopsie liquide à la recherche d'ADN tumoral circulant, outil ayant l'avantage d'être moins invasif, répétable et pouvant permettre le monitoring et la détection précoce de rechute durant le suivi de la maladie.

L'objectif de ce travail, ayant lieu à l'occasion d'un changement de méthode au laboratoire de génétique moléculaire du CHU de Brest et lié à la nécessité de conserver une technique sur biopsie liquide, est la comparaison des performances analytiques de trois méthodes pour la détection non invasive des mutations activatrices et des mécanismes de résistance dans les cancers broncho-pulmonaires.

2 Matériels et méthodes

2.1 Sélection des patients

44 échantillons plasmatiques résiduels issus de 37 patients ont été inclus à partir des 202 demandes reçues, entre janvier 2020 et décembre 2022 au laboratoire de génétique moléculaire du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Brest (en provenance du CHU mais aussi des centres hospitaliers de Morlaix, Landerneau et Quimper), pour une recherche de mutations sur ADN tumoral circulant dans le cadre de cancer broncho-pulmonaire suspecté ou avéré. La demande d'examen précise s'il s'agissait d'une recherche de mutation activatrice en l'absence de tissu tumoral analysable ou d'une recherche de mutation de résistance. Les différents échantillons ont été sélectionnés de telle sorte que toutes les mutations connues les plus fréquentes dans le gène *EGFR* soient testées et que les valeurs

de fréquences alléliques (Variant Allele Frequency, VAF) soient distribuées des plus élevées jusqu'aux plus faibles mesurées par séquençage NGS (méthode Ion Torrent AmpliSeq) qui est la technique de routine. Ont été inclus préférentiellement les patients pour lesquels le génotypage tumoral retrouvait une mutation (exception faite pour quelques mutations retrouvées uniquement sur ctDNA, comme la mutation *EGFR* G719C, pour lesquelles nous disposions de peu d'échantillons) et pour lesquels était conservée une quantité de plasma suffisante pour une nouvelle extraction. Douze échantillons pour lesquels aucune mutation n'avait été détectée sur ctDNA ont également été inclus pour mettre en évidence un éventuel gain de sensibilité avec les techniques évaluées.

2.2 Prélèvement et extraction d'ADN

Les échantillons sanguins ont été prélevés sur tubes BCT Cell-Free DNA (Streck) de 10 mL, acheminés à température ambiante au laboratoire dans les trois jours, avant d'être centrifugés. A partir des plasmas conservés à -80°C , l'ADN libre circulant a été extrait sur billes magnétiques avec l'extracteur Maxwell et le kit Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit (Promega) en utilisant au minimum 1 mL de plasma selon les consignes du fabricant, puis quantifié par fluorométrie avec le Qubit dsDNA HS assay kit (Life Technologies). Les acides nucléiques ont ensuite été stockés à -20°C .

2.3 NGS Ion Torrent Ampliseq

La méthode Ion Torrent Ampliseq est la technique de routine au CHU de Brest avec laquelle avaient été analysés tous les échantillons inclus depuis 2020. Elle utilise le séquençage NGS

Ion torrent qui repose sur la variation de pH pour la mise en évidence de mutations somatiques sur ADN issu de biopsies tissulaires (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) DNA) et sur cfDNA. Le panel réalisé à Brest permet de rechercher avec une sensibilité analytique de 0.5 % (pour une profondeur minimale de 1000X) les mutations G719S (c.2155G>A), G719C (c.2155G>T), G719A (c.2156G>C), G719N (c.2156G>A), L858R (c.2573T>G), les délétions de l'exon 19, T790M (c.2369C>T) ainsi que les variants rares dans les exons 18 à 21 du gène *EGFR* (séquence de référence NM_005228.3) ; et les mutations dans l'exon 2 du gène *KRAS* (NM_33360.3).

La préparation des bibliothèques grâce au kit Ion Ampliseq library kit 2.0 avec des amorces maison adaptées aux exons des gènes d'intérêt (commandées chez Life Technologies) nécessite un volume de 12 µL de cfDNA avant amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) en émulsion sur sphères et séquençage massivement parallèle sur Ion PGM sequencer (Thermo Fisher Scientific) avec des puces 318. Durant le séquençage les sphères recouvertes d'amplicons de bibliothèques se retrouvent dans des puits où sont ajoutés les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) un par un. Une mesure de pH est effectuée après chaque ajout de dNTP et en cas d'incorporation d'un nucléotide au brin complémentaire un ion H⁺ est libéré lors de la création de la liaison phosphodiester modifiant le pH détecté au fond de chaque puits. Les données brutes (ionogramme) obtenues permettent ensuite de reconstituer les séquences qui sont ensuite alignées sur le génome de référence hg19. L'analyse bioinformatique est effectuée sur le logiciel NextSeq (JSI medical systems).

2.4 qPCR SensiScreen

La technique SensiScreen (Pentabase) est conçue pour la détection et l'identification de mutations somatiques par PCR quantitative (qPCR) multiplex en temps réel (sonde TaqMan spécifiques d'allèles) appliquée dans ce travail sur des ADN issus de biopsie liquide chez les patients atteints de cancer. Le Kit SensiScreen Liquid Dispense ready Assays pour *EGFR* cible les mutations suivantes dans les exons 18 à 21 du gène *EGFR* :

- G719A (c.2156G>C), G719C (c.2155G>A), G719S (c.2155G>T)
- 35 délétions de l'exon 19 (Annexe I)
- S768I (c.2303G>T) et L861Q (c.2582T>A) dans un même mix
- T790M (c.2369C>T)
- 21 insertions dans l'exon 20 (Annexe I) réparties dans deux pools
- L858R (c.2573T>G et c.2573_2574TG>GT)

La technique est dite ultra-sensible et affirme détecter, dans le cas d'analyse sur biopsie liquide, jusqu'à une copie d'ADN muté pour un délai de rendu de résultat rapide inférieur à 3h.

Selon les recommandations du fabricant, pour chaque échantillon nous avons utilisé 5 µL d'ADN par puits à une concentration comprise entre 0,1 et 1 ng/µL, la concentration optimale étant de 1 ng/µL. Une réaction comprenant jusqu'à 8 puits (7 mix mutation et 1 mix référence), le volume total nécessaire est alors de 40 µL d'ADN par échantillon. L'analyse a été effectuée sur Lightcycler 480 II (Roche) en suivant le protocole de PCR indiqué par le fabricant (Annexe II). Le Multiplex I cfDNA Reference Standard Set (Horizon), qui comprend les mutations *EGFR* p.Lys858Arg, p.Glu746_Arg750del, Thr790Met et p.Val769_Asp770insAlaSerVal à une fréquence allélique de 5 %, a été utilisé comme contrôle

à une concentration de 0.5 ng/ μ L. L'interprétation des résultats a été faite sur le logiciel LightCycler 480 SW 1.5.1.

Les quantités de réactifs nous permettaient d'effectuer 20 tests. Au total 17 échantillons ont été analysés avec un contrôle lors de trois séries différentes. Ils ont été testés avec les 8 mix ou seulement une partie d'entre eux comprenant au minimum la mutation détectée avec la technique NGS Ion Torrent Ampliseq et une autre mutation à priori non retrouvée.

2.5 PCR digitale

2.5.1 Principe

La PCR digitale (ddPCR) est une technique rapide et très sensible dérivée de la qPCR, mise au point en 1999 par Volgenstein et al (68) et qui permet la détection et la quantification absolue de séquences présentes en très faible quantité. Elle repose sur le principe de partitionnement de l'échantillon à analyser dans des milliers de compartiments (gouttelettes ou micropuits) contenant idéalement une seule molécule cible. Cette répartition des cibles d'ADN suit une loi de Poisson. Chaque gouttelette se comporte comme une réaction de PCR individuelle, le fractionnement de l'échantillon permettant d'amplifier chaque cible indépendamment des autres. Cela limite le risque de faux négatif lié aux séquences en excès qui peuvent masquer le signal des séquences en plus faible quantité dans une PCR classique. Comme pour la qPCR des sondes fluorescentes de type TaqMan ou un intercalant de l'ADN fluorescent peuvent être utilisés pour identifier l'ADN ciblé amplifié. La technique est donc particulièrement adaptée aux événements rares notamment à l'étude de l'ADN fœtal ou des mutations somatiques minoritaires sur cfDNA.

Mutation	Amorce/sonde	Séquence
L858R (c.2573T>G)	Amorce Forward	5'-GCAGCATGTCAAGATCACAGATT-3'
	Amorce Reverse	5'-CCTCCTTCTGCATGGTATTCTTTCT-3'
	Sonde WT	5'-HEX-AGTTTGGC{CAG}CCCAA-BHQ1/MGB-NFQ-3'
	Sonde mutée	5'-6FAM-AGTTTGGC{CCG}CCCAA-BHQ1/MGB-NFQ-3'
T790M (c.2369C>T)	Amorce Forward	5'-GCCTGCTGGGCATCTG-3'
	Amorce Reverse	5'-TCTTTGTGTTCCCGGACATAGTC-3'
	Sonde WT	5'-HEX-ATGAGCTG{CGT}GATGAG-BHQ1/MGB-NFQ-3'
	Sonde mutée	5'-6FAM-ATGAGCTG{CATG}ATGAG-BHQ1/MGB-NFQ-3'
C797S (c.2390G>C)	Amorce Forward	5'-CATCTGCCTCACCTCCAC-3'
	Amorce Reverse	5'-TCTTTGTGTTCCCGGACAT-3'
	Sonde WT	5'-HEX-TTCGG{CTG}CCTCCTG-BHQ1/MGB-NFQ-3'
	Sonde mutée	5'-6FAM-TTCGGC{TCC}CTCCTG-BHQ1/MGB-NFQ-3'
Del19	Amorce Forward	5'-GAAAGTAAAATTCCCGTCGCTAT-3'
	Amorce Reverse	5'-ACCCCCACACAGCAAAGC-3'
	Sonde WT	5'-HEX-AATTAAGAGAAGCAACATC-BHQ1/MGB-NFQ-3'
	Sonde mutée	5'-6FAM-ACATCGAGGATTCCTTGT-BHQ1/MGB-NFQ-3'
G12C (c.34G>T)	Amorce Forward	5'-GCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACT-3'
	Amorce Reverse	5'-GCTGTATCGTCAAGGCACTCTT-3'
	Sonde WT	5'-HEX-TTGGAGC{TGG}TGGCGTA-BHQ1/MGB-NFQ-3'
	Sonde mutée	5'-6FAM-TTGGAGC{TTG}T{G}GCGTA-BHQ1/MGB-NFQ-3'

Tableau IV : Détails des amorces et des sondes d'hydrolyse des différents essais. Le design pour les mutations L858R, T790M, C797S et G12C est tiré des travaux de Oxnard et al (70) et pour les Del19 de Yung et al (71).

2.5.2 Amorces et sondes d'hydrolyse

Les sondes d'hydrolyse sont constituées d'un fluorophore (FAM ou HEX) lié de manière covalente à l'extrémité 5' d'un oligonucléotide et d'un désactivateur ou quencher (BHQ-1 ou MGB-NFQ) à l'extrémité 3'. Les amorces et les sondes d'hydrolyse spécifiques à chaque allèle sauvage et muté ont été designées à partir de la littérature (Tableau IV) et commandées chez Eurogentec. Les couples d'amorces et de sondes sont reconstitués à 100 μM avant d'être mélangés dans une solution à 20X, contenant 5 μM de sonde et 9 μM de chaque amorce, et stockée à -20°C jusqu'à utilisation.

2.5.3 Technique

La PCR digitale a été réalisée sur le QX200 ddPCR System (Biorad) selon les recommandations du fabricant. Pour chaque échantillon 9 μL d'ADN ont été ajoutés à 10 μL de supermix Droplet PCR 2X (Biorad) ainsi que 1 μL de chaque mix d'amorces et de sondes pour une concentration finale de 450 nM d'amorces et 250 nM de sondes. Après génération des gouttelettes grâce au QX200 Droplet Generator la PCR est réalisée avec le programme suivant : 95°C pendant 10 minutes, (94°C pendant 30 secondes, 1 min d'hybridation) x40 cycles, 98°C pendant 10 minutes puis passage à 4°C . La température optimale d'hybridation a été préalablement déterminée par gradient de température d'hybridation pour chaque couple amorce/sonde à l'aide d'un ADN contrôle issu d'un ADN FFPE muté pour le variant étudié. La lecture de fluorescence est ensuite faite dans le QX200 Droplet Reader et l'analyse des données est réalisée grâce au logiciel QX Manager 1.2.

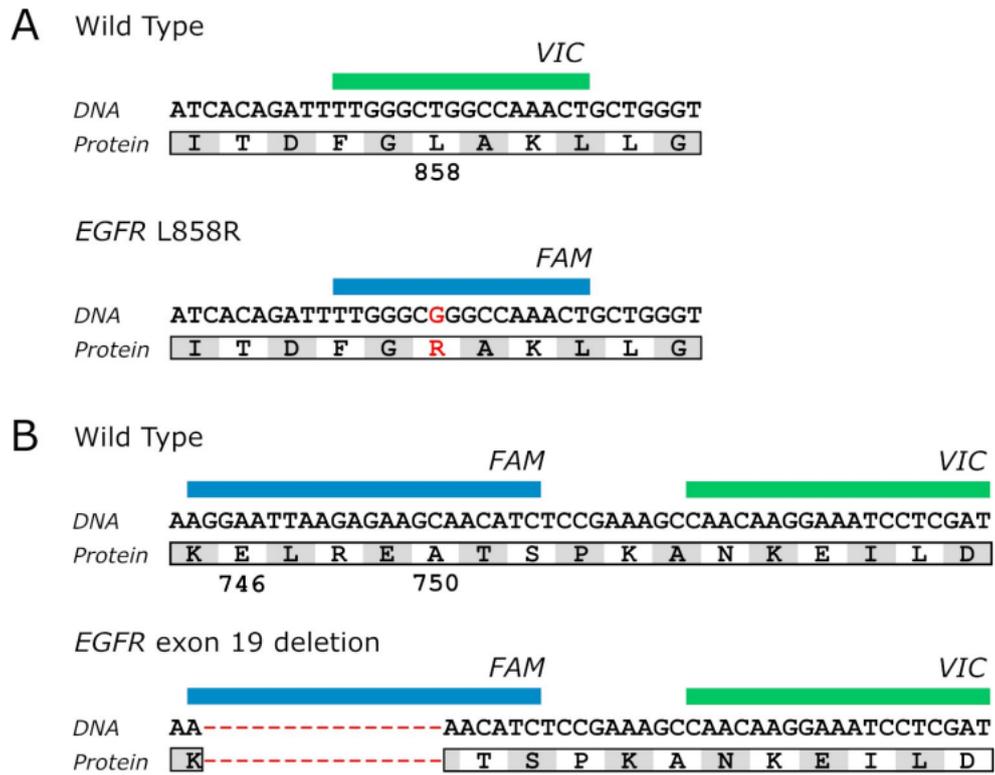


Figure 7 : Design des sondes d'hydrolyse pour la détection en PCR digitale de la mutation

EGFR L858R (A) et des délétions de l'exon 19 (B), tirée de (72).

Nous avons réalisé des essais en ddPCR pour 5 mutations différentes, 4 mutations du gène *EGFR* (L858R (c.2573T>G), T790M (c.2369C>T), C797S (c.2390G>C) et les délétions en phase de l'exon 19 (Del19)) et une mutation du gène *KRAS* (G12C (c.34G>T)) avec des amorces spécifiques. L'échantillon commercial Multiplex I cfDNA Reference Standard Set (Horizon) était le contrôle pour les mutations L858R, T790M et Del19 (VAF à 5 %) à une concentration de 0.5 ng/μL après dilution. Pour chaque mutation, les essais ont été mis au point en duplex avec mélange de sondes d'hydrolyse spécifiques de l'allèle sauvage (Wild Type, WT) marquée en HEX et de l'allèle muté marqué en FAM. Le design est différent pour détecter les délétions de l'exon 19 du gène *EGFR*, la sonde marquée en HEX reconnaissant une séquence non polymorphe (référence) dans l'exon 19 quand celle marquée en FAM s'hybride sur les nucléotides du hotspot des délétions (Figure 7). La perte du signal bleu FAM révèle donc la présence d'une délétion (Figure 8).

Toutes les mutations ont été répliquées lors de deux séries avec entre 10 et 14 échantillons en dupliquats au total par mutation. La reproductibilité entre les deux séries a été évaluée avec deux échantillons positifs pour chacune des mutations L858R, Del19 et G12C et trois échantillons négatifs pour chacune des 5 mutations. La répétabilité a également été évaluée pour les mutations L858R, Del19 et G12C avec 5 échantillons au total déposés en quadruplicats lors d'une même série. Tous les échantillons de cfDNA ont été dosés par fluorométrie sur Qubit (dsDNA HS assay kit (Life Technologies)) avant d'être analysés

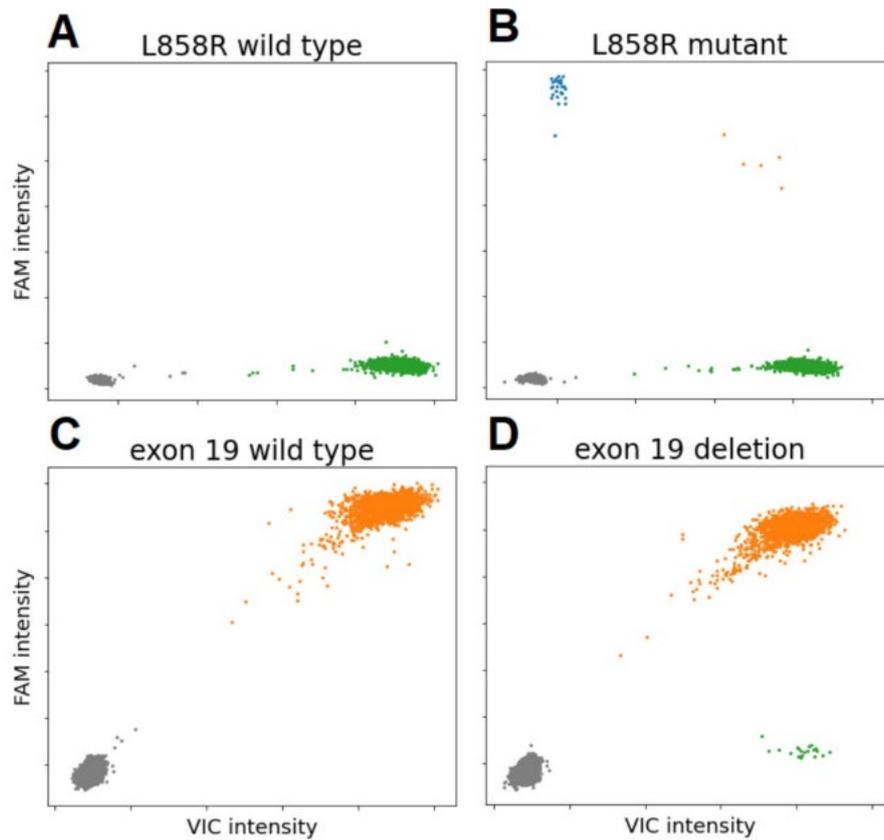


Figure 8 : Exemples de résultats de PCR digitale selon deux designs différents. La mutation L858R est détectée par la présence d'évènements positifs dans le canal FAM (B) contrairement à l'échantillon sauvage (A) et pour les Del19 les échantillons sauvages ne présentent que des évènements positifs dans les deux canaux (C) quand les délétions sont mises en évidence par la perte du signal dans le canal Fam (D), tirée de (72).

2.6 Analyse des données

2.6.1 Détection qualitative des variants

Pour l'interprétation des résultats de qPCR un échantillon est dit positif pour une mutation donnée si son Cycle threshold (Ct) est inférieur ou égal à 40 et négatif en cas de Ct supérieur à 40. La fréquence allélique du variant muté ainsi que le nombre de copie absolu peuvent être estimés grâce à la différence entre le Ct de la mutation donnée et le Ct de l'analyse de référence, si 5 ng d'ADN ont été utilisés (Annexe III).

Lors de la mise au point des essais en PCR digitale la limite de blanc (LOB), la limite de détection (LOD) et la linéarité ont été déterminées pour chaque mutation testée comme décrit dans l'étude de Milbury (69). A partir d'ADN FFPE résiduels issus de patients suivis pour un cancer pulmonaire nous avons à chaque fois réalisé une dilution en cascade d'un ADN positif pour la mutation d'intérêt et analysé 16 échantillons sauvages en dupliquats. Tous les ADN FFPE ayant servis pour la validation de performances de ces essais ont été dosés sur Qubit avec le kit dsDNA HS assay (Life Technologies) puis dilués pour obtenir une concentration finale d'environ 0.5 ng/ μ L, proche des concentrations observées pour le cfDNA après extraction sur plasma, avant d'être analysés selon la technique décrite précédemment.

La distribution des molécules d'ADN cibles dans les gouttelettes se fait indépendamment du statut mutationnel et suit une loi de Poisson. Le nombre de gouttelettes a d'abord été converti en nombre de molécules d'ADN présentes dans l'échantillon grâce aux nombres moyens de cibles sauvages (λ_w) et mutées (λ_m) par gouttelette, ce qui permet ensuite à partir des 16 échantillons WT de calculer le taux moyen de faux positif (λ_{FP}). Les seuils de positivité pour chacun des deux canaux ont été déterminés grâce à l'échantillon avec la titration la

Caractéristiques	
Effectif global	36
Sexe	Femmes : 18/36 (50.0 %) Hommes : 18/36 (50.0 %)
Age moyen au diagnostic	68.9 ans (34 – 90 ans)
< 50 ans	2/36 (5.6 %)
50 – 59 ans	5/36 (13.9 %)
60 – 69 ans	9/36 (25.0 %)
70 – 79 ans	14/36 (38.9 %)
≥ 80 ans	6/36 (16.6 %)
Type de tumeur	31/36
Adénocarcinome (ADK)	27/31 (87.2 %)
Carcinome épidermoïde	1/31 (3.2 %)
Carcinome indifférencié	1/31 (3.2 %)
ADK avec composante NE à PC	1/31 (3.2 %)
Autre	1/31 (3.2 %)
Stade de la maladie	
I	1/30 (3.3 %)
II	0
III	2/30 (6.7 %)
IV	27/30 (90.0 %)
Statut métastatique	
M1a	7/30 (23.3 %)
M1b	5/30 (16.7 %)
M1c	15/30 (50 %)
Dont localisation cérébrale	6/30 (20 %)

Tableau V : Caractéristiques cliniques et biologiques des patients inclus.

plus importante, c'est-à-dire celui avec la VAF la plus élevée. Les nuages de points correspondants aux copies sauvages et aux copies mutées ont ainsi été délimités et des seuils, similaires pour tous les échantillons d'un même essai, ont été fixés de manière relativement stringente (les régions sont plus étroitement définies) pour favoriser la sensibilité analytique. Toute gouttelette supérieure aux seuils fixés dans les échantillons sauvages est donc considérée comme une cible mutée et donc un évènement faux positif. Le taux moyen de faux positif permet ensuite de calculer la LOB et la LOD (69). Pour déterminer le statut mutationnel positif ou négatif des différents cfDNA inclus nous avons utilisé la valeur brute de la limite de détection et non le ratio pour ne pas être impacté par le nombre total de gouttelettes générées pour chaque échantillon.

La linéarité a été déterminée grâce à la titration de l'allèle muté pour chaque essai. Un ADN FFPE positif pour le variant testé est dilué à 6 reprises dans un ADN WT pour ce même variant pour une gamme finale de dilution de 32 %, 16 %, 8 %, 4 %, 2 %, 1 % et 0.5 % (exception faite de la mutation C797S pour laquelle la gamme de dilution ne comprend que 10 %, 5 %, 2.5 %, 1.25 % et 0.62 % du fait de l'absence d'ADN FFPE avec une fréquence allélique suffisante à disposition). Chaque niveau de la titration est également passé en dupliquats.

2.6.2 Analyse statistique

L'analyse statistique des données a été réalisée grâce au logiciel Stata software, version 15 (StataCorp, College Station US). Les tests étaient binaires pour le statut mutationnel (critère principal) avec un risque de première espèce fixée à 5 %. La comparaison des résultats impliquant des données catégorielles a été réalisée avec un test de Chi2 ou un test exact de

Caractéristiques	
Tabagisme	
Absent	14/30 (46.7 %)
Sevré	15/30 (50.0 %) (5 à 50 PA)
Actif	1/30 (3.3 %) (50 PA)
Exposition amiante associée	2
Exposition solvants associée	1
Altération intra tumorale	
Oui	29/35 (82.9 %)
EGFR Del19	16/29 (55.3 %)
EGFR L858R	9/29 (31.0 %)
EGFR Ins 20	1/29 (3.4 %)
EGFR G719A	1/29 (3.4 %)
KRAS G12C	2/29 (6.9 %)
EGFR T790M*	3/29
EGFR C797S*	2/29
EGFR L861Q*	1/29
BRAF V600E*	1/29
MET*	2/29
Non**	6/35 (17.1 %)

Tableau V (suite) : Caractéristiques cliniques et biologiques des patients inclus.

**Mutations associées, **Résultat négatif, non contributif, matériel insuffisant ou absence d'information*

Fisher quand la relation entre les variables quantitatives, pour l'estimation de la fréquence allélique a été étudiée par le coefficient de corrélation de Spearman du fait de leur distribution statistique non normale.

3 Résultats

3.1 Cohorte de patients

Les 43 échantillons analysés proviennent de 36 patients comprenant autant d'hommes que de femmes et un âge moyen au diagnostic de 68.9 ans avec une majorité de patients entre 70 et 79 ans (14 sur 36 soit 38.9 %) (Tableau V). Nous n'avons pas pu avoir accès au dossier de cinq patients pour lesquels le type histologique tumoral, le stade de la maladie ou encore les facteurs de risque de cancer ne sont pas connus. Parmi les 31 patients avec des données cliniques, la majorité sont atteints d'adénocarcinomes bronchiques (27 sur 31 soit 87.2 %). A noter qu'une patiente (P7) a bénéficié d'une recherche de mutation sur cfDNA avant que la lésion primitive ne soit connue et n'est finalement pas atteinte d'un cancer bronchique mais d'un carcinome rénal métastatique au niveau pulmonaire. Elle n'a pas été prise en compte pour le reste des caractéristiques cliniques et biologiques de la cohorte. Presque tous les diagnostics ont été fait à un stade métastatique de la maladie (27 sur 30 soit 90 % de stade IV au diagnostic) avec 50 % de patients multi-métastatiques (stade M1c) et 6 patients présentant une ou plusieurs localisations cérébrales. Près de la moitié des patients sont non-fumeurs quand l'autre moitié présente un tabagisme sévère. Il existe quelques cas d'exposition professionnelle avec 2 patients fumeurs (50 PA) ayant de plus été exposés à

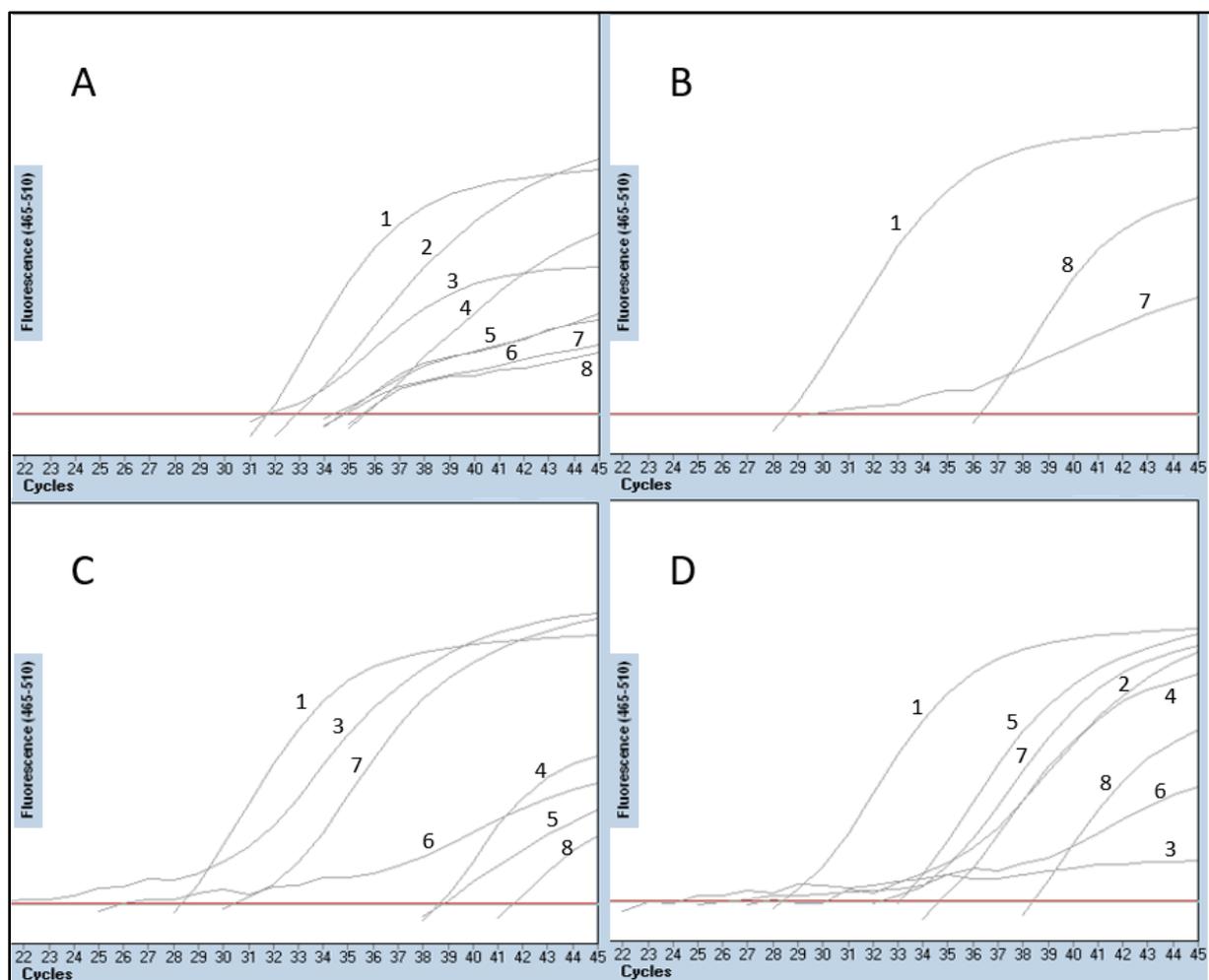


Figure 9 : Résultats obtenus par qPCR SensiScreen pour 4 échantillons : les échantillons 200093 (A), 200155 (B), 210031 (C) et le contrôle (D). 1 : Référence, 2 : Del19, 3 :Ins2, 4 :T790M, 5 :G719, 6 :S768I, 7 :Ins1 et 8 :L858R.

l'amiante et une patiente non fumeuse exposée à différents solvants. La grande majorité des patients sont porteurs d'altérations intra tumorale avec, comme dans les données de la littérature, une majorité de délétions dans l'exon 19 du gène *EGFR* (55.3 %) et de mutations L858R (31.0 %).

3.2 PCR SensiScreen

Au total 17 échantillons issus de 16 patients différents ont été testés par PCR quantitative SensiScreen (voir Annexe IV). Lors du génotypage intra tumoral 6 patients étaient porteurs d'une Del19, 4 d'une mutation L858R (2 échantillons testés pour la patiente P13) et une d'une insertion dans l'exon 20. Parmi les 5 patients n'ayant pas eu de résultats contributifs lors du génotypage intra tumoral on retrouve lors de l'analyse de cfDNA par NGS Ion Torrent Ampliseq une Del19, une mutation G719S, une mutation G719C, une mutation S768I et un résultat négatif.

Sur les trois séries effectuées les résultats sont similaires et difficilement interprétables quel que soit le prélèvement observé. En effet les Ct sont presque toujours inférieurs à 40 cycles, y compris pour toutes les mutations qui ne sont pas attendues positives, donnant lieu à des résultats aberrants avec jusqu'à 6 mutations positives dans un seul échantillon si l'on suit *stricto sensu* les règles d'interprétation du fabricant (Figure 9A). On observe tout de même un signal de fluorescence plus net pour les mutations déjà connues au niveau intra tumoral (Figure 9B et 9C), mais avec une croissance pas systématiquement exponentielle et un Ct parfois supérieur à ceux de mutations absentes comme le met en évidence le contrôle (Figure 9D). Celui-ci a été passé lors des trois séries avec des résultats montrant systématiquement des Ct inférieurs à 40 cycles pour toutes les mutations et avec un Ct plus

	L858R	T790M	C797S	Del19	G12C
Moyenne gouttelettes générées	16 343	18 911	18 472	15 722	19 494
Moyenne molécules WT*	512	653	438	604	1070
Nb moyen de faux positif (λ_{FP})	0.03	0.62	0	1.35	0.82
LOB brute	1.1	2.7	0.8	4.1	3.1
LOB Ratio	0.217 %	0.415 %	0.183 %	0.673 %	0.291 %
LOB m/WT**	461	241	547	149	343
LOD brute	4.7	7.1	4.2	9.0	7.7
LOD ratio	0.910 %	1.086 %	0.948 %	1.490 %	0.717 %
LOD m/WT**	110	92	105	67	139

Tableau VI : Limites de blanc et limites de détection des différents essais

*Nombre moyen de molécules WT dans les tests sauvages ayant servis lors des essais
respectifs

**Nombre de molécules WT dans lesquelles une molécule mutée peut être détectée

élevé pour la mutation L858R que pour le mix des mutations G719 qui ne sont pas présentes dans l'échantillon.

La quantité d'ADN utilisée par échantillon et les résultats non contributifs obtenus n'ont pas permis d'estimer la VAF des mutations mises en évidence selon les données fournies par le fabricant (Annexe III).

3.3 PCR digitale

3.3.1 LOB, LOD et linéarité

Les 17 échantillons sauvages (WT) qui ont été utilisés pour chacun des essais ont été déposés en dupliquats et les données brutes obtenues pour chaque duplicat ont été poolées. Les formules décrites par Milbury et al (69) appliquées aux échantillons WT ont déterminé que la LOB pour la mutation *EGFR* L858R dans un échantillon avec un nombre moyen de molécules cibles d'ADN de 512 est de 1 molécule mutée pour 461 molécules WT et la LOD est de 1 molécule mutée pour 110 molécules WT. Les LOB et LOD de tous les essais sont détaillées dans le Tableau VI. La LOD représente, pour chaque mutation, la plus haute sensibilité qui peut être atteinte pour un échantillon unique déposé en duplicat lors d'une réaction.

Les séries de titration pour chaque mutation ont permis d'évaluer la linéarité des essais. La relation entre les ratios muté sur sauvage attendu et observé n'est pas parfaitement linéaire, pour autant le coefficient de détermination R^2 reste élevé pour les 5 essais (entre 0.88 et 0.99). Les données retrouvent globalement un ratio muté sur sauvage supérieur au ratio attendu et mettent en évidence une déviation plus ou moins importante de la courbe

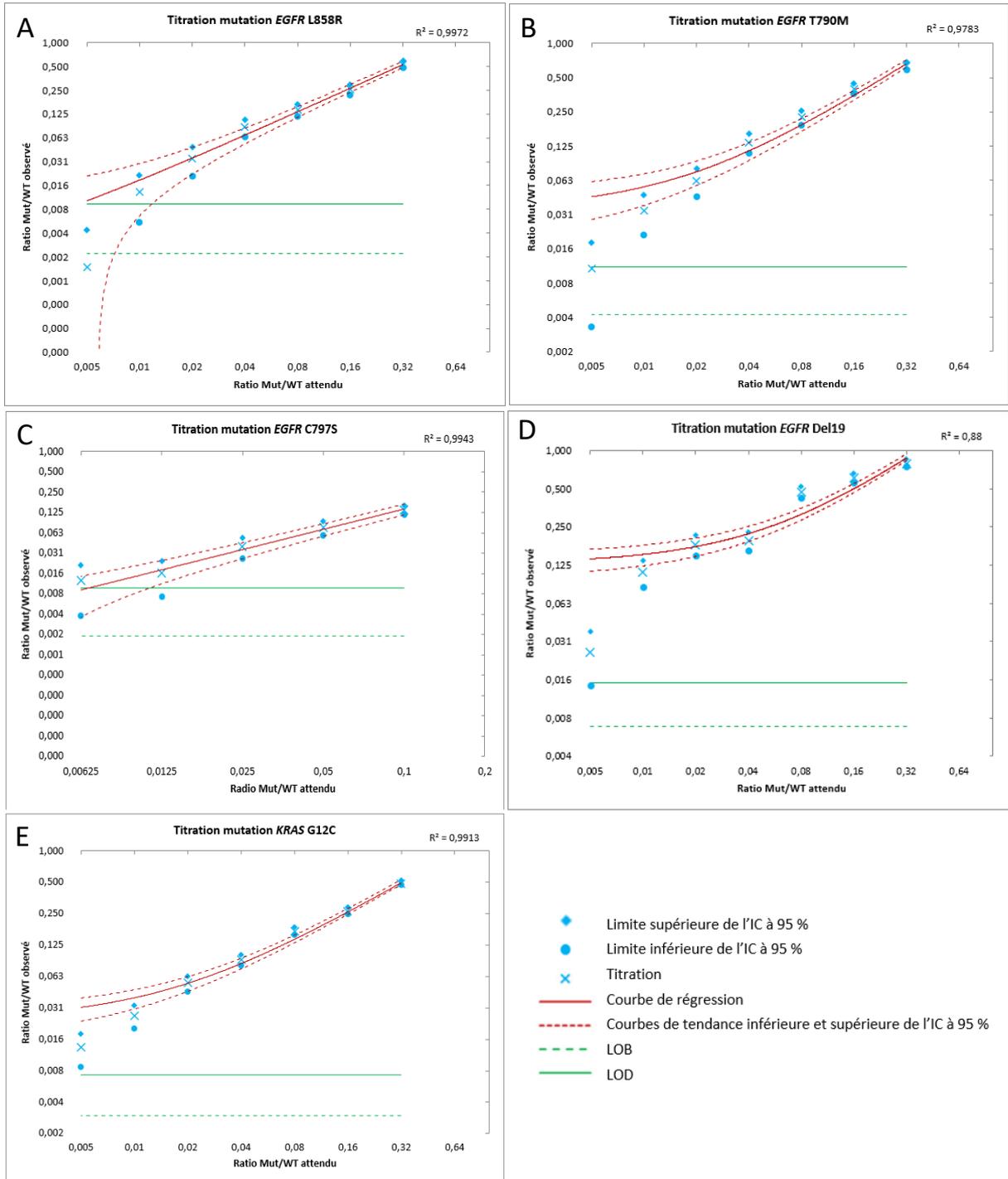


Figure 10 : Titration des différentes mutations en ddPCR.

de régression pour les valeurs de VAF les plus faibles dans les 5 essais du fait de la présence d'évènements faux positifs. Pour la mutation *EGFR* L858R (Figure 10A) la titration du dernier échantillon (VAF 0.5 %) donne un résultat inférieur à la limite de blanc, ne pouvant donc pas être distingué du bruit de fond. La sensibilité pour cet essai reste correcte jusqu'à une VAF de 1% mais la borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % à ce niveau est inférieure à la LOD tout en restant supérieure à la LOB, ce qui indique qu'en cas de répétition des analyses les résultats seront toujours significativement différents du bruit de fond mais une partie d'entre eux (supérieure à 5 %) ne sera pas correctement détectée. La situation est similaire pour la mutation C797S (Figure 10C) avec un risque plus élevé de faux négatifs à une VAF de 0.1 %. Pour les trois autres essais (Figure 10B, D et E) la sensibilité est bonne jusqu'à une VAF de 0.1 % avec des valeurs associées à des intervalles de confiance toujours supérieures à la LOD.

3.3.2 Concordance et fréquence allélique

33 échantillons plasmatiques résiduels issus de 29 patients différents ayant été préalablement analysés par NGS Ion Torrent Ampliseq l'ont également été par ddPCR pour une ou deux mutations parmi les 5 disponibles. La technique de routine mettait en évidence 8 mutations *EGFR* L858R, 8 mutations *EGFR* Del19, 3 mutations *EGFR* T790M, 0 mutation *EGFR* C797S et 2 mutations *KRAS* G12C. La concordance sur cette cohorte entre les deux techniques pour les mutations *EGFR* L858R, *EGFR* T790M et *KRAS* G12C est de 100 % (Annexe V). Contrairement au NGS, la PCR digitale met en évidence une mutation *EGFR* C797S dans l'échantillon 210039 d'un patient (P26) qui présente la mutation au niveau intra tumoral. Les autres résultats pour ces mutations sont concordants. La comparaison des

Mutation	Ratio muté/non muté IonPGM	Ratio muté/non muté ddPCR	p-value
L858R	10/9	10/9	1
T790M	3/12	3/12	1
C797S	0/15	1/14	0.99
Del19	10/9	8/11	0.74
G12C	4/11	4/11	1

Tableau VII : Ratio muté/non muté pour chaque mutation selon les techniques NGS Ion

Torrent Ampliseq et ddPCR

résultats pour la mutation EGFR Del19 retrouve deux discordances avec l'échantillon 200064 qui a été déposé lors des deux séries et qui revient une fois négatif (seulement 4 évènements positifs pour une LOD à 9) et une fois positif (Annexe VI) et avec l'échantillon 200075 qui malgré en passage en quadrupliques est négatif. La concordance pour cette mutation entre les deux techniques n'est que de 89.5 %. Pour toutes les mutations la p-value calculée à l'aide d'un test de Fisher est élevée (entre 0.74 et 1) confirmant l'indépendance des résultats obtenus vis-à-vis de la technique utilisée et donc l'absence de différence significative entre les deux techniques (Tableau VII).

L'estimation de la fréquence allélique des différents échantillons positifs en ddPCR a été réalisée et comparée à la VAF théorique obtenue avec la technique de routine (Annexe VII). Le coefficient de Spearman est globalement élevé pour toutes les mutations (0.66 à 0.99) mettant en évidence une bonne corrélation entre les VAF obtenues (Tableau VIII).

3.3.3 Sensibilité clinique

35 patients ont bénéficié d'une recherche de mutations activatrices par NGS Ion Torrent Ampliseq sur prélèvements tissulaires et sur biopsie liquide. Sur les 30 patients avec un résultat significatif au niveau intra tumoral (29 tumeurs mutées et un résultat négatif) 27 étaient porteurs d'altérations pour lesquelles un essai par ddPCR a été mis en place et 25 échantillons ont été analysés par ddPCR à la recherche de cette même mutation. On retrouve 10 échantillons mutés *EGFR* L858R, 9 mutés *EGFR* Del19 dont un également muté *EGFR* T790M, 1 muté *EGFR* T790M, 2 mutés *EGFR* C797S, 1 muté *EGFR* T790M et C797S et 2 mutés *KRAS* G12C (Tableau IX).

Mutation	Médiane VAF NGS Ion Ampliseq	Médiane VAF ddPCR	Coefficient de corrélacion
L858R	0.04	0.043	0.99
T790M	0.025	0.031	0.80
C797S	/	/	/
Del19	0.04	0.029	0.66
G12C	0.105	0.073	0.94

Tableau VIII : Médianes des fréquences alléliques (VAF) retrouvées pour les échantillons positifs par technique NGS Ion Torrent Ampliseq et par ddPCR et coefficient de corrélacion de Spearman

Sur 27 échantillons plasmatiques issus de patients atteints de cancers bronchiques mutés dans *EGFR* ou *KRAS* la PCR digitale identifie 21 mutations, ce qui donne une sensibilité clinique globale de 77.8 % pour la recherche de mutation sur cfDNA. On retrouve des évènements mutés pour un échantillon plasmatique (200075) mais qui restent insuffisants (inférieur à la LOD) pour définir l'échantillon comme positif pour une Del19. Aucun faux positif n'a été observé.

4 Discussion

Nous avons comparé deux méthodes diagnostiques à une méthode de routine qu'est le NGS Ion Torrent Ampliseq qui a été considéré comme méthode de référence, pour la mise en évidence sur cfDNA de mutations activatrices dans les gènes *EGFR* et *KRAS* dans un contexte de cancer pulmonaire. La cohorte correspond globalement aux données rapportées dans la littérature avec une grande majorité d'adénocarcinome (87.2 %) et une part importante de non-fumeur (46.7 %). La seule différence concerne le sexe ratio avec une atteinte majoritairement féminine non retrouvée (sexe ration à 1 dans notre cohorte). Cet écart pourrait être liée à l'indication des prescriptions au CHU de Brest qui ne suit pas strictement les recommandations comme le montre la présence d'un cas de cancer rénal ou de deux patients anciens fumeurs n'ayant pas de localisations métastatiques au diagnostic initial.

La qPCR SensiScreen n'a pas fourni de résultats concluants du fait d'un volume d'ADN nécessaire trop important peu compatible avec les quantités et concentrations de ctDNA, alors même que nous n'avons ciblé que les mutations les plus fréquentes dans *EGFR*. Une

	L858R	Del19	T790M	C797S	G12C
Echantillons testés	10	9	3	3	2
Positif	8	7	3	1	2
Négatif	2	2	0	2	0

Tableau IX : Résultats de l'analyse par ddPCR pour les échantillons issus de patients porteurs d'une mutation au niveau intra tumoral.

recherche d'altérations génétiques au diagnostic initial nécessite au minimum de couvrir les gènes *EGFR*, *ALK* et *ROS1*, ce qui exigerait de prélever un plus grand volume lors de la prise de sang, sans pour autant s'affranchir de la faible quantité de cfDNA disponible. Cette technique ne permet pas non plus d'estimer la fréquence allélique du variant et ne semble pas dans l'état actuel adaptée à la mise en évidence de mutations somatiques sur cfDNA.

La PCR digitale a montré de bons résultats sur les 5 mutations pour lesquelles des essais ont été réalisés avec une concordance globale inférieure à 100 % mais sans différence significative entre les techniques. Pour la mutation *EGFR* Del19 le résultat négatif des échantillons 200075 et 200064 peut s'expliquer par des volumes d'ADN extraits insuffisants avec des concentrations faibles (0.282 et 0.188 ng/ μ L) et la mauvaise reproductibilité pour l'échantillon 200064 peut aussi être lié au fait que l'ADN utilisé entre les deux séries est issu d'extractions différentes, soulignant un biais pré analytique. Le design spécifique par perte de signal pour la détection des délétions de l'exon 19 du gène *EGFR* sans préciser leurs points de cassure exacts est associé à la LOD la plus élevée, ce qui peut s'expliquer par plusieurs facteurs. D'abord il est difficile de designer des amorces et des sondes d'hybridation dans une séquence complexe ; cela nous a contraint de tester deux lots différents de sondes et d'amorces pour les Del19 du fait de premiers résultats non concluants ; comme le souligne la température d'hybridation plus faible (44°C contre 55°C pour les autres essais) liée entre autres à la séquence oligonucléotidique de ces amorces. De plus la mise en évidence d'une délétion par perte de signal implique qu'en cas de nombre de molécules par gouttelette supérieur à un la perte de ce signal peut être masquée si une autre cible présente n'est pas délétée et fixe bien la sonde marquée en FAM. Cela peut donc sous-estimer la proportion d'évènements mutés. La mise au point d'essai pour la mutation *EGFR* T790M est également plus difficile car elle est localisée dans une région riche en

guanine et en cytosine qui présente une homologie de séquence avec le proto-oncogène receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 (HER2) et une séquence d'éléments répétés adjacente à la mutation (69). Ces caractéristiques peuvent expliquer une moins bonne spécificité des amorces et des sondes ciblant la mutation à l'origine d'un taux de faux positifs et donc d'une LOD plus élevés. Une hypothèse avancée pour expliquer les différences de LOD entre les mutations est la génération d'erreurs par la polymérase à l'origine de faux positifs, erreurs survenant plus fréquemment en cas de transition qu'en cas de transversion (69). Ce facteur pourrait participer à la LOD plus élevée pour la mutation *EGFR* T790M mais n'est pas valable pour la mutation *KRAS* G12C. Il aurait été préférable d'utiliser pour la détermination des LOB et des LOD des échantillons plasmatiques WT issus de patients atteints de cancer autre qu'un cancer pulmonaire pour s'affranchir d'éventuelles mutations dans *EGFR* à un très faible niveau qui n'auraient pas été détectées par NGS et qui pourraient être à l'origine de faux positifs. Enfin la LOD et donc la sensibilité analytique de la ddPCR dépend de la quantité d'ADN évaluée, il a été démontré qu'en cas d'apport infini d'ADN la LOD s'améliore jusqu'à atteindre un plateau à un niveau proche du taux de faux positif mesuré (69). C'est dans notre cas une limite encore une fois lié aux principales caractéristiques biologiques du cfDNA, à savoir sa faible quantité et sa grande hétérogénéité in vivo.

La technique apporte un gain de sensibilité analytique par rapport au NGS avec la mise en évidence d'une mutation *EGFR* C797S sur cfDNA à une fréquence allélique faible (0.7 %) (inférieure à la sensibilité avec un intervalle de confiance à 95 % déterminée pour cette mutation) et avec des ratios événements mutés sur sauvages observés globalement supérieurs aux ratios attendus pour les 5 mutations. La sensibilité diffère pour chacune des cinq mutations et ces résultats liés à la mesure d'un très faible nombre de réplicats

soulignent l'importance de déterminer les limites de blanc et de détection même pour des tests très sensibles.

Le PCR digitale a permis dans notre cohorte la détection de mutations avec une sensibilité de 77.8 % et une spécificité de 100 %. La sensibilité clinique est comparable aux données de la littérature qui varient entre 63 et 82 % (72) mais une des autres limites de notre étude est le faible nombre d'échantillons analysés et ces résultats gagneraient à être confirmés et affinés sur une cohorte plus importante. La technique permet également un gain de temps par rapport aux panels NGS qui bien que largement utilisés pour la caractérisation moléculaire des cancers peuvent nécessiter plusieurs semaines pour le rendu de résultats. Le délai moyen de rendu pour la technique NGS Ion Torrent Ampliseq au CHU de Brest est de 10 jours, la PCR digitale pouvant être lancée sans avoir à attendre un nombre d'échantillons suffisants pour une série complète permet d'obtenir un résultat plus rapide pour une prise en charge adaptée plus précoce. Le coût qui est un autre critère médico-économique important n'a pas été évalué ici mais est évidemment à prendre en compte pour la mise en place en routine de la ddPCR pour la détection de mutation dans *EGFR*. Le choix des mutations recherchées est un facteur limitant des techniques ciblées et ici l'ajout des mutations dans l'exon 18 (codon 719) serait probablement nécessaire pour couvrir les mutations activatrices les plus fréquentes dans *EGFR*. Si la recherche des mutations Del19 et L858R semblaient suffisantes il y a 10 ans, il y a un intérêt à étendre les panels avec la recherche de mutations dites rares d'*EGFR*, notamment chez les patients négatifs pour toutes autres altérations moléculaires pour lesquels une amélioration du pronostic serait alors possible.

Ces résultats démontrent que la PCR digitale est une méthode rapide et sensible pour la détection des mutations somatiques dans le plasma grâce à une limite de détection faible qui peut faire défaut à d'autres techniques moléculaires et peut également être un outil pour le monitoring de la réponse aux traitements et le suivi de la maladie.

En oncologie, le domaine des mutations activatrices et de résistances, notamment dans le gène *EGFR*, associée aux CBNPC est en évolution constante avec un impact sur le comportement biologique de la tumeur et sur la réponse aux traitements. Actuellement les ITK représentent le traitement de première intention pour les CBNPC mutés *EGFR* et le développement d'ITK de 3^e génération permet d'être efficace malgré les premières mutations associées à une résistance aux traitements de 1^{ère} et 2^e génération et en cas d'atteinte du système nerveux central. Mais un patient traité par ITK développera toujours une résistance acquise qui aboutira à une progression de la maladie. La recherche de mutations acquises secondaire au traitement, impliquées dans le développement et la progression de CBNPC et la compréhension de leur physiopathologie est indispensable. De nouvelles cibles potentielles dans différents cancers dont le cancer pulmonaire sont identifiées, comme les protéines E2F2 et EMR2 dont l'expression dans les ADK favorise la cancérogénèse (73). Le développement de stratégies thérapeutiques plus efficaces sur les mutations rares et les mécanismes de résistances émergents associé au développement et à la mise en place en routine de tests diagnostiques ultra sensibles reste nécessaire pour une meilleure prise en charge thérapeutique ciblée et individualisée des patients atteints de cancer bronchique.

L'apport de la biopsie liquide pour le diagnostic, la détection précoce de progression et l'adaptation thérapeutique dans ces situations est indéniable. La répétition de biopsies liquides à la recherche d'acquisition de mutation, de gène de fusion ou même de transformation en CBPC est profitable, même si la sensibilité et la spécificité des méthodes d'analyse peut être un frein étant donné qu'un résultat négatif sur biopsie liquide nécessite actuellement d'être toujours validé avec une biopsie tissulaire (13). Le développement de cet outil avec l'étude de la fragmentomique et de la méthylation est prometteur mais n'est pas utilisé actuellement en routine.

Contrairement à d'autres cancers, il n'existe à ce jour pas de dépistage organisé du cancer du poumon en France, toutes les conditions pour une mise en œuvre efficace et sûre n'étant pas réunies selon l'HAS lors d'un rapport sur la question datant de 2016. En février 2022, après actualisation de la revue de la littérature, l'HAS revoit sa position et recommande l'engagement d'un programme pilote (74). En effet quinze revues systématiques issues de différents pays, incluant des méta analyses ou non, semblent montrer un intérêt au dépistage des personnes à risque plus élevé (fumeurs et anciens fumeurs principalement) pour permettre une détection des cancers et une prise en charge plus précoces afin de tenter de réduire la mortalité associée. Cependant la réduction de la mortalité spécifique dans ces études doit être pondérée par les effets délétères liés au surdiagnostic et à la détection de faux positifs à l'origine de bilans diagnostiques invasifs pouvant mener à des complications plus ou moins graves (de 0.1 à 1.3%). Pour donner suite aux préconisations de l'HAS, l'INCa a initié en 2022 un programme pilote de dépistage des cancers bronchopulmonaires par tomodensitométrie thoracique faible dose, afin de confirmer les données des revues systématiques qui permettraient la mise en place d'un programme de dépistage organisé efficace et sûr à l'échelle nationale. L'utilisation des biopsies liquides et

l'analyse de l'ADN tumoral circulant ne sont pas évoquées mais pourraient peut-être représenter une alternative ou un complément à la tomographie. Cette approche est moins invasive pour le dépistage du cancer bronchopulmonaire chez les fumeurs et anciens fumeurs, mais également de toutes formes de cancer en général. Cela permettrait d'effectuer une détection plus précoce et un premier tri des patients avant d'envisager des examens plus invasifs, de diminuer les risques liés à l'exposition aux rayonnements et au surdiagnostic. Encore une fois les performances diagnostiques des tests utilisés ici sont cruciales et il semble que la meilleure approche actuellement soit l'étude de la méthylation de l'ADN libre circulant pour la détection et la détermination de l'origine des cancers (75). Il serait de plus nécessaire de déterminer la population cible, les mutations recherchées et la prise en charge qui découlerait des résultats obtenus.

5 Conclusion

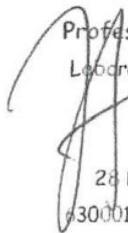
Nous avons donc comparé rétrospectivement les performances analytiques de trois techniques, deux « maison » et une commerciale, pour la détection des mutations activatrices et de résistance principales dans les gènes *EGFR* et *KRAS* qui sont les plus fréquentes dans les adénocarcinomes bronchiques. Ainsi nous avons utilisé 43 échantillons plasmatiques issus de 36 patients suivis pour un cancer pulmonaire pour lesquels une recherche ciblée de mutations avait été adressée au laboratoire de génétique moléculaire du CHU de Brest. La qPCR Pentascreen a donné des résultats d'interprétation difficile, du fait de Ct limites associés parfois à un signal de fluorescence dont la croissance n'est pas exponentielle. De plus la technique n'estime pas la fréquence allélique du variant dans les échantillons. Malheureusement une des limites de l'analyse sur ADN tumoral circulant est sa faible quantité, non prévisible et sans valeur normale actuellement. Les résultats de la PCR digitale, réalisée avec des sondes et des amorces designées d'après des essais dans la littérature, sont satisfaisants pour les 5 mutations testées. Malgré deux échantillons discordants (faux négatifs) pour la recherche de délétion dans l'exon 19, en lien avec des concentrations d'ADN faibles, un design particulier pour détecter les délétions en phase localisées dans l'exon 19 du gène *EGFR* et une limite de détection un peu plus élevée, la technique ne présente pas de différence significative avec la technique de référence du laboratoire pour toutes les mutations. Un gain de sensibilité analytique a permis la mise en évidence d'une mutation C797S à une fréquence allélique faible de 0.7 % chez un patient pour qui cette mutation sera mise en évidence par la suite sur une biopsie tissulaire. De plus, le rho de Spearman montre que les fréquences alléliques obtenues sont corrélées entre les

deux techniques. La PCR digitale semble ici la technique la plus adaptée pour la détection d'évènements rares caractéristiques des mutations somatiques dans les tumeurs solides. Son application pour l'ADN tumoral circulant est prometteuse bien qu'il persiste des limites à l'utilisation et l'interprétation des résultats avec cette nouvelle approche qui fait l'objet de développements récents.

La Présidente du jury

Pierre CLAVELOU
Doyen-Directeur



Professeur Isabelle CREVEAUX
Laboratoire de Biochimie Médicale
Biologie Moléculaire
Faculté de Médecine
28 Place Henri Dunant B.P. 38
63001 CLERMONT FERRAND CEDEX 1

6 Références bibliographiques

1. WHO / Cancer [internet] : <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. Panorama des cancers en France – Edition 2022. INCa [internet] <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Les-cancers-les-plus-frequents/Cancer-du-poumon>
3. Malhotra J, Malvezzi M, Negri E et al. Risk factors for lung cancer worldwide. Eur Respir J. 2016 Sep;48(3):889-902.
4. Zhou F, Zhou C. Lung cancer in never smokers – the East Asian experience. Transl Lung Cancer Res. 2018 Aug;7(4):450-463.
5. Sun Y, Ren Y, Zhaoyuan et al. Lung adenocarcinoma from East Asian never-smokers is a disease largely defined by targetable oncogenic mutant kinases. J Clin Oncol. 2010 Oct20;28(30):4616-20.
6. Mezquita L, Jové M, Nadal E et al. High prevalence of somatic oncogenic driver alterations in patients with NSCLC and Li-Fraumeni syndrome. J Thorac Oncol. 2020 Jul;15(7):1232-1239.
7. Dietel M, Bubendorf L, Dingemans AM et al. Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC) : recommendations of the European Expert Group. Thorax. 2016 Feb;71(2):177-84.
8. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J et al. The IASLC Lung cancer staging project : Proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (Eight) edition of the TNM classification for the lung cancer. J Thorac Oncol. 2016 Jan;11(1):39-51.

9. Eberhardt WEE, Mitchell A, Crowley J et al. The IASLC Lung cancer staging project : Proposals for the revision of the M descriptors in the forthcoming eighth edition of the TNM classification of lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2015 Nov;10(11):1515-22.
10. Chargari C, Dhermain F. Brain metastases from non small-cell lung carcinoma : from standard treatment to personalised therapies. *Rev Mal Respir Actual*. 2013;5(5):547-56.
11. Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2018 Jan 11;378(2):113-125.
12. Peters S, Camidge R, Shaw A et al. Alectinib versus Crizotinib in untreated ALK-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2017 31;377(9):829-838.
13. Koulouris A, Tsagkaris C, Corriero AC et al. Resistance to TKIs in EGFR-mutated non-small cell lung cancer : from mechanisms to new therapeutic strategies. *Cancers (Basel)*. 2022 Jul 8;14(14):3337.
14. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 1996 2, 561-566.
15. Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med*. 2005 Jul 14;353(2):172-87.
16. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2000 Oct 13;103(2):211-25.
17. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ et al. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*. 1990 Mar 2;247(4946):1079-82.
18. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004 May 20;350(21):2129-39.

19. Sokolenko AP, Imyanitov EN. Molecular diagnostics in clinical oncology. *Front Mol Biosci.* 2018 Aug 27;5:76.
20. Passaro A, Jänne PA, Mok T et al. Overcoming therapy resistance in *EGFR*-mutant lung cancer. *Nat cancer.* 2021 2,377-391.
21. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature.* 2014 Jul 31;511(7511):543-50.
22. Barlesi F, Mazieres J, Merlio JP et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer : results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet.* 2016 Apr 2;387(10026):1415-1426.
23. Bordi P, Tiseo M, Barbieri F et al. Gene mutations in small-cell lung cancer (SCLC) : results of a panel of 6 genes in a cohort of Italian patients. *Lung Cancer.* 2014 Dec;86(3):324-8.
24. Peifer M, Fernandez-Cuesta L, Sos ML et al. Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nat Genet.* 2012 Oct;44(10):1104-10.
25. Makino T, Mikami T, Hata Y et al. Comprehensive biomarkers for personalized treatment in pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma : a comparative analysis with adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg.* 2016 Jun;102:1694-701.
26. Couraud S. Cancer bronchique non à petites cellules – Référentiels Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique, 18^e édition, 2022.
27. Corral de la Fuente E, Olmedo Garcia ME, Gomez Rueda A et al. Targeting KRAS in non-small cell lung cancer. *Front Oncol.* 2022 Jan 10;11:792635.

28. Rekhtman N, Paik PK, Arcila ME et al. Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung : lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations. Clin Cancer Res. 2012 Feb 15;18(4):1167-76.
29. Jänne PA, Engelman JA, Johnson BE. Epidermal growth factor receptor mutations in non-small-cell lung cancer : implications for treatment and tumor biology. J Clin Oncol. 2005 May 10;23(14):3227-34.
30. Harrison PT, Vyse S, Huang PH. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. Semin Cancer Biol. 2020 Apr;61:167-179.
31. Sequist LV, Martins RG, Spigel D et al. First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. J Clin Oncol. 2008 May 20;26(15):2442-9.
32. Imyanitov EN, Iyevleva AG, Levchenko EN. Molecular testing and targeted therapy for non small cell lung cancer : current status and perspectives. Crit Rev Oncol Hematol. 2021 Jan;157:103194.
33. Santoni-Rugiu E, Melchior LC, Urbanska EM et al. Intrinsic resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in *EGFR*-mutant non-small cell lung cancer : differences and similarities with acquired resistance. Cancers (Basel). 2019 Jul 1;11(7):923.
34. Vyse S, Huang PH. Targeting *EGFR* exon 20 insertion mutations in non-small cell lung cancer. Signal Transduct Target Ther. 2019 Mar 8;4 5.
35. Recondo G, Facchinetti F, Olausson KA et al. Making the first move in EGFR-driven or ALK-driven NSCLC : first-generation or next-generation TKI ? Nat Rev Clin Oncol. 2018 Nov;15(11):694-708.
36. Méthodologie d'évaluation d'un test compagnon associé à une thérapie ciblée - Guide méthodologique . HAS 2014

37. Soda M, Choi YL, Enomoto M et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007 Aug 2;448(7153):561-6.
38. Davies KD, Le AT, Theodoro MF et al. Identifying and targeting *ROS1* gene fusions in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2012 Sep 1;18(17):4570-4579.
39. Reungwetwattana T, Nakagawa K, Cho BC et al. CNS response to osimertinib versus standard epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2018 Aug 28;JCO2018783118.
40. Reguart N, Remon J. Common EGFR-mutated subgroups (Del19/L858R) in advanced non-small-cell lung cancer : chasing better outcomes with tyrosine kinase inhibitors. *Future Oncol*. 2015;11(8):1245-57.
41. Jänne PA, Neal JW, Camidge DR et al. Antitumor activity of TAK-788 in NSCLC with EGFR exon 20 insertions. *J Clin Oncol*. 2019 May 37(15):9007-9007.
42. Brindel A, Althakfi W, Barritault M et al. Uncommon *EGFR* mutations in lung adenocarcinoma : features and response to tyrosine kinase inhibitors. *J Thorac Dis*. 2020 Sep;12(9):4643-4650.
43. Cho JH, Lim SH, An HJ et al. Osimertinib for patients with non-small-cell lung cancer harboring uncommon EGFR mutations : A multicenter, open-label, phase II trial (KCSG-LU15-09). *J Clin Oncol*. 2020 Feb 10 ;38(5) :488-495.
44. Camidge DR, Kim HR, Ahn MJ et al. Brigatinib versus crizotinib in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2018 Nov 22;379(21):2027-2039.
45. Shaw AT, Bauer TM, De Marinis F et al. First-line lorlatinib or crizotinib in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2020 Nov 19;383(21):2018-2029.

46. Planchard D, Smit EF, Groen HJM et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAF V600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer : an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017 Oct;18(10):1307-1316.
47. Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL et al. Lung cancer : current therapies and new targeted treatments. *Lancet.* 2017 Jan 21;389(10066):299-311.
48. Mandel P, Metais P. Nuclear acids in human blood plasma. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948 Feb;142(3-4):241-3.
49. Lo YMD, Chiu RWK. Prenatal diagnosis : progress through plasma nucleic acids. *Nat Rev Genet* 2007 Jan;8(1):71-7.
50. Stroun M, Anker P, Maurice P et al. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 1989;46:318-322.
51. Lo YMD, Corbett N, Chamberlain PF et al. Presence of foetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet Lond Engl.* 1997 Aug16;350(9076):485-7.
52. Lo YMD, Chiu RWK. Genomic analysis of fetal nucleic acids in maternal blood. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2012;13:285-306.
53. De Vlaminck I, Valantine HA, Snyder TM et al. Circulating cell-free DNA enables noninvasive diagnosis of heart transplant rejection. *Sci Transl Med.* 2014 Jun 18;6(241):241ra77.
54. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif.* 2019 Mar;17:100087.
55. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Oberhofer A et al. New perspectives on the importance of cell-free DNA biology. *Diagnostics (basel).* 2022 Sep3;12(9):2147.

56. Wang E, Batey A, Struble C et al. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2013 Jul;33(7):662-6.
57. Dawson SJ, Tsui DWY, Murtaza M et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2013 Mar 28;368(13):1199-209.
58. Huang RSP, Xiao J, Pavlick DC et al. Circulating cell-free DNA yield and circulating tumor-DNA quantity from liquid biopsies of 12 139 cancer patients. *Clin Chem.* 2021 Nov 1;67(11):1554-1566.
59. Lo YMD, Han DSC, Jiang P et al. Epigenetics, fragmentomics, and topology of cell-free DNA in liquid biopsies. *Science.* 2021 Apr 9;372(6538):eaaw3616.
60. Sun K, Jiang P, Chan KCA et al. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Oct 6;112(40):E5503-12.
61. Jiang P, Sun K, Peng W et al. Plasma DNA end-motif profiling as a fragmentomic marker in cancer, pregnancy, and transplantation. *Cancer Discov.* 2020 May;10(5):664-673.
62. Cheng N, Skead K, Ouellette T et al. Early signatures of breast cancer up to seven years prior to clinical diagnosis in plasma cell-free DNA methylomes. *Res Sq.* 2022
63. Lamb YN, Dhillon S. Epi proColon 2.0 CE : a blood-based screening test for colorectal cancer. *Mol Diagn Ther.* 2017 Apr;21(2):225-232.
64. Kustanovich A, Schwartz R, Peretz T et al. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biol Ther.* 2019;20(8):1057-1067.
65. Jaiswal S, Ebert BL. Clonal hematopoiesis in human aging and disease. *Science.* 2019 Nov 1;366(6465):eaan4673.
66. Hu Y, Ulrich BC, Supplee J et al. False-positive plasma genotyping due to clonal hematopoiesis. *Clin Cancer Res.* 2018 Sep 15;24(18):4437-4443.

67. Marass F, Stephens D, Ptashkin R et al. Fragment size analysis may distinguish clonal hematopoiesis from tumor-derived mutations in cell-free DNA. *Clin Chem*. 2020 Apr 1;66(4):616-618.
68. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 3;96(16):9236-41.
69. Milbury CA, Zhong Q, Lin J et al. Determining lower limits of detection of digital PCR assays for cancer-related gene mutations. *Biomol Detect Quantif*. 2014 Sep;1(1):8-22.
70. Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y et al. Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin Cancer Res*. 2014 Mar 15;20(6):1698-1705.
71. Yung TKF, Allen Chan KC, Mok TSK et al. Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2009 Mar 15;15(6):2076-84.
72. Williamson DFK, Marris SRN, Rojas-Rudilla V et al. Detection of EGFR mutations in non-small cell lung cancer by droplet digital PCR. *PLoS One*. 2022 Feb 24;17(2):e0264201.
73. Feliciano A, Garcia-Mayea Y, Jubierre L et al. miR-99a reveals two novel oncogenic proteins E2F2 and EMR2 and represses stemness in lung cancer. *Cell Death Dis*. 2017 Oct 26;8(10):e3141.
74. Haute Autorité de Santé. Dépistage du cancer bronchopulmonaire par scanner thoracique faible dose sans injection : actualisation de l'avis de 2016. Rapport d'orientation. Février 2022.
75. Jamshidi A, Liu MC, Klein EA et al. Evaluation of cell-free DNA approaches for multi-cancer early detection. *Cancer Cell*. 2022 Dec 12;40(12):1537-1549.e12.

7 Annexes

Annexe I : Liste des mutations *EGFR* détectées avec le kit Sensiscreen

EGFR mutations detected with SensiScreen®				
Assay	CDS mutation	Amino acid substitution	Cosmic ID	Assay
EGFR exon 18	c.2156G>C	p.Gly719Ala	COSM6239	
	c.2155G>A	p.Gly719Ser	COSM6252	
	c.2155G>T	p.Gly719Cys	COSM6253	
EGFR exon 19	c.2240_2251del12	p.L747_T751>S	COSM6210	
	c.2239_2247del19	p.L747_E749delLRE	COSM6218	
	c.2238_2255del18	p.E746_S752>D	COSM6220	
	c.2235_2249del15	p.E746_A750delELREA	COSM6223	
	c.2236_2250del15	p.E746_A750delELREA	COSM6225	
	c.2235_2246del12	p.E746_E749delELRE	COSM28517	
	c.2239_2256del18	p.L747_S752delLREATS	COSM6255	
	c.2237_2254del18	p.E746_S752>A	COSM12367	
	c.2240_2254del15	p.L747_T751delLREAT	COSM12369	
	c.2240_2257del18	p.L747_P753>S	COSM12370	
	c.2239_2248>C (complex)	p.L747_A750>P	COSM12382	
	c.2239_2251>C (complex)	p.L747_T751>P	COSM12383	
	c.2237_2255>T (complex)	p.E746_S752>V	COSM12384	
	c.2235_2255>AAT (complex)	p.E746_S752>I	COSM12385	
	c.2237_2252>T (complex)	p.E746_T751>V	COSM12386	
	c.2239_2258>CA (complex)	p.L747_P753>Q	COSM12387	
	c.2239_2256>CAA (complex)	p.L747_S752>Q	COSM12403	
	c.2237_2253>TTGCT (complex)	p.E746_T751>VA	COSM12416	
	c.2238_2252>GCA (complex)	p.L747_T751>Q	COSM12419	
	c.2238_2248>GC (complex)	p.L747_A750>P	COSM12422	
	c.2237_2251del15	p.E746_T751>A	COSM12678	
	c.2236_2253del18	p.E746_T751delELREAT	COSM12728	
	c.2235_2248>AATTC (complex)	p.E746_A750>IP	COSM13550	
	c.2235_2252>AAT (complex)	p.E746_T751>I	COSM13551	
	c.2235_2251>AATTC (complex)	p.E746_T751>IP	COSM13552	
	c.2237_2257>TCT (complex)	p.E746_P753>VS	COSM18427	
	c.2237_2251del15	p.L747_T751delLREAT	COSM23571	
	c.2233_2247del15	p.K745_E749delKELRE	COSM26038	
	c.2234_2248del15	p.K745_A750>T	COSM1190791	
	c.2236_2248>CAAC (complex)	p.E746_A750>QP	COSM13557	
	c.2232_2249del18	p.K745_A750delKELREA	COSM221565	
	c.2237_2253>TA (complex)	p.E746_T751>V	COSM133192	
	c.2239_2257>T (complex)	p.L747_P753>S	COSM133197	
	c.2239_2253>AAT (complex)	p.L747_T751>N	COSM51503	
c.2236_2259>ATCTCG (complex)	p.E746_P753>IS	COSM133191		
EGFR exon 20	c.2369C>T	p.Thr790Met (T790M)	COSM6240	
	c.2303G>T	p.Ser768Ile	COSM6241	
	c.2300_2301insCAGCGTGGA	p.D770_N771insSVD	COSM3728433	Multiplex 1
	c.2302_2303insCGCTGGCCA	p.A767_S768insTIA	COSM12425	Multiplex 1
	c.2307_2308ins15	p.V769_D770insMASVD	COSM28638	Multiplex 1
	c.2307_2308insGCCAGCGTG	p.V769_D770insASV	COSM12376	Multiplex 1
	c.2308_2309insCAGCGTGG	p.V769_D770insASV	COSM12426	Multiplex 1
	c.2308_2309insGGTCTGTGG	p.V769_D770insGVV	COSM18430	Multiplex 1
	c.2308_2309insGTT	p.D770>GY	COSM12427	Multiplex 1
	c.2309_2310AC>CCAGCGTG GAT	p.V769_D770insASV	COSM13558	Multiplex 1
	c.2310_2311insAGCGTGGAC	p.D770_N771insSVD	COSM85749	Multiplex 1
	c.2310_2311insGGCACA	p.D770_N771insGT	COSM1238029	Multiplex 1
	c.2310_2311insGGGTTT	p.D770_N771insGF	COSM655155	Multiplex 1
	c.2310_2311insGGT	p.D770_N771insG	COSM12378	Multiplex 1
	c.2310_2311insAACCCAC	p.H773_V774insNPH	COSM48920	Multiplex 1+2
	c.2310_2311ins9GCGTGGACA	p.D770_N771insSVD	COSM13428	Multiplex 2
	c.2316_2317insNNN	p.P772_H773insX	COSM21597	Multiplex 2
	c.2319_2320insAACCCAC	p.H773_V774insNPH	COSM12381	Multiplex 1+2
	c.2319_2320insCAC	p.H773_V774insH	COSM12377	Multiplex 2
	c.2319_2320insCCCCAC	p.H773_V774insPH	COSM12380	Multiplex 2
	c.2320_2321insCCACG	p.H773_V774insAH	COSM1238028	Multiplex 2
	c.2321_2322insCCACGT	p.V774_C775insHV	COSM18432	Multiplex 2

Annexe I : suite

	c.2322_2323insCACGTG	p.V774_C775insHV	COSM22948	Multiplex 2
EGFR exon 21	c.2573T>G	p.Leu858Arg	COSM6224	
	c.2573_2574TG>GT	p.Leu858Arg	COSM12429	
	c.2582T>A	p.Leu861Gln	COSM6213	

Annexe II : Protocole de PCR temps réel SensiScreen

Protocol	Temperature	Time	Number of cycles	Data (channel)
Hold	95°C	2 min	1	-
Cycling	94°C	15 sec	45	FAM™/SYBR® (470 nm/510 nm) HEX™/VIC™/TET™ (538 nm/551 nm) Measure fluorescence intensity at the end of each cycle
	60°C	60 sec		

Annexe III : Fréquence allélique théorique de la mutation et nombre de copies absolu pour les échantillons de 5 ng environ. $\Delta Ct = Ct_{\text{mutation}} - Ct_{\text{reference}}$

ΔCt	Mutant allele frequency	Ct	Copies (using 5 ng DNA)
ΔCt 3	≈ 10 %	≈ 32	≈ 160
ΔCt 7	≈ 1 %	≈ 35	≈ 16
ΔCt 8	≈ 0.5 %	≈ 36	≈ 8
ΔCt 8.5	≈ 0.3 %	≈ 37	≈ 5
ΔCt 9	≈ 0.2 %	≈ 38	≈ 3
ΔCt 10	≈ 0.1 %	≈ 39	1-2

Annexe IV : Détails des caractéristiques cliniques et biologiques des patients et méthodes diagnostiques testées. En gras les échantillons analysés. ADK :

Adénocarcinome bronchique, NC : Non Contributif, RT : Radiothérapie, Chimio : Chimiothérapie

*Age au diagnostic initial, **Méthode(s) avec la(es)quelle(s) l(es) échantillon(s) a(ont) été testé(s)

°Localisation cérébrale au diagnostic ou progression cérébrale

Patient	Sexe	Age*	Anatomopathologie	Génotypage intratumoral	Date Prise de sang	Indication	Génotypage cfDNA	VAF	Thérapies ciblées (date de début de ttt)	Autres traitements	FDR et Devenir	M**
P1-200025	M	56	ADK T4N3M1c	Del19 (c.2235_2249del)	18/06/2019 12/02/2020 07/04/2020	A A A	Négatif Négatif Négatif	/ / /	Tagrisso (fev 2019)	Chimio (juil 2020) Puis PEC palliative	Non-fumeur	ddPCR (G12C)
P2-200059	M	75	ADK T4N1Mx	Négatif	14/04/2020	R	Négatif	/	Tagrisso (sept 2019)	PEC palliative après progression (avr 2020)	Tabagisme sévéré (50 PA) + amiante	ddPCR (C797S et Del19)
P3-200064	F	80	/	/	10/02/2017 24/04/2020	R R	NC Del Ex19	/ 1%	/	/	/	qPCR et ddPCR (Del19 et C797S)
P4-200075	M	34	ADK avec compo NE à PC T4NxM1c	Del19 (C.2236_2250del) + T790M (c.2369C>T)	04/05/2017 23/05/2017 08/08/2017 22/11/2018 28/01/2020 18/05/2020	A R R A A A	NC Négatif Négatif Négatif Del19 Del19	/ / / / 41 % 3 %	Giotrif (juin 2016) Tagrisso (juil 2017) Tagrisso (dec 2018)	3 lignes chimio + RT encéphalique Progression (fev 2018, nov 2018, juin 2020°)	Non-fumeur	ddPCR (Del19 et L858R)
P5-200083	M	79	ADK T2bN1M1c°	Del19 (c.2236_2250del)	23/12/2019 02/06/2020	R R	Négatif Négatif	/ /	Iressa (fev 2019) Tagrisso (dec 2019)	RT, RT encéphalique, chimio Progression (juin 2018, sept 2019, aout 2020°) PEC Palliative (2021)	Tabagisme sévéré (30 PA)	ddPCR (T790M et C797S)
P6-200093	F	70	ADK T2N3M0	Del Ex19 (c.2239_2251delinsC)	20/10/2017 06/11/2017 29/11/2017 18/06/2020	A A A A	Négatif Négatif Négatif Del Ex19 + T790M (c.2369C>T)	/ / / 11%/2%	Tarceva Tagrisso	RT-chimio RTx2 Progression (aout 2017, juin 2020°)	Tabagisme sévéré (5 PA) Décès aout 2021	qPCR et ddPCR (T790M et G12C)
P7-200102	F	87	Carcinome rénal à cellules claires métastatique	/	08/07/2020	A	S768I	1%	∅	RT encéphalique	Non-fumeuse Origine asiatique	qPCR

Annexe IV : suite 1

Patient	Sexe	Age*	Anatomopathologie	Génotypage intratumoral	Date Prise de sang	Indication	Génotypage cfDNA	VAF	Thérapies ciblées (date de début de ttt)	Autres traitements	FDR et Devenir	M**
P8-200117	F	68	/	Del19 (c.2239_2248delinsC)	24/08/2020	A	Del19	1 %	/	/	/	ddPCR (G12C et L858R)
P9-200127	M	70	ADK TxNxM1b	G12C (c.34G>T)	15/09/2020	A	G12C	3 %	∅	RT	Tabagisme sévère (20 PA)	ddPCR (G12C)
P10-200145	M	65	ADK T2N3M1c	Del19 (c.2240_2257del) + BRAF V600E (c.1799T>A)	15/01/2019 20/10/2020 29/06/2021	A R R	Del Ex19 Del Ex19 NC	/ 1% /	Tagrisso Tafinlar Mekinist	RT x4 Chimio (janv 2021) Progression (janv 2020, sept 2020, oct 2020°, janv 2021)	Tabagisme sévère (14 PA)	qPCR
P11-200148	M	74	ADK TxN2M1c	L858R (c.2573T>G)	22/10/2020	A	Négatif	/	/	/	Tabagisme actif (50 PA)	ddPCR (G12C)
P12-200072-210054	F	74	ADK T2N2M1b	L858R (c.2573T>G)	06/05/2020 27/05/2020 01/09/2021	R R R	Négatif Négatif Négatif	/ / /	Iressa (sept 2019) Tagrisso (juin 2020)	RT (oct 2021) Progression (mai 2020, sept 2021)	Non-fumeuse	qPCR et ddPCR (T790M et L858R)
P13-200155-210025	F	74	ADK TxNxM1c	L858R (c.2573T>G)	06/11/2020 18/05/2021	A R	L858R L858R	2% 3%	Tagrisso (nov 2020)	RT, chimio après progression (juin 2021)	Non-fumeuse	qPCR et ddPCR (L858R et C797S)
P14-200156	M	82	ADK T2N3M1a	Del Ex19 (c.2235_2249del) + T790M (c.2369C>T)	22/02/2017 11/05/2017 12/07/2017 06/11/2020	A A R A	Négatif Négatif Del Ex19 Del Ex19 + T790M	/ / / 4+0,86%	Iressa Tarceva Tagrisso (août 2017)	Progression (juil 2017) RT (dec 2018) Chimio (nov 2020) PEC palliative	Tabagisme sévère (30 PA) K pulm chez 3 frères et soeur	qPCR et ddPCR (T790M et Del19)
P15-200173	F	70	ADK T2aN2M1c°	Del19 (c.2236_2250del)	01/12/2020	A	Del19	2 %	Tagrisso (jan 2021)	Chirurgie méta cérébelleuse (janv 2021) RT site op (mai 2021)	Non-fumeuse Décès sept 2022	ddPCR (Del19 et G12C)
P16-210003	F	67	ADK T3N3M1b	Del Ex19 (c.2235_2249del)	14/01/2021	R	Del Ex19	3%	Tagrisso (juin 2019) Tagrisso (jan 2022)	RT (juin 2019) Progression (janv 2021) Chimio (mai, oct 2021)	Tabagisme sévère (15 PA)	qPCR
P17-210007-220048	F	53	ADK TxNxM1a	L858R (c.2573T>G)	05/08/2019 25/11/2019 25/01/2021 18/05/2021 27/09/2022	R R R R R	NC Négatif Négatif Négatif Négatif	/ / / / /	Tarceva (oct 2018)	RT (juin 2021)	Non-fumeuse	ddPCR (T790M, L858R et Del19)

Annexe IV : suite 2

Patient	Sexe	Age*	Anatomopathologie	Génotypage intra tumoral	Date Prise de sang	Indication	Génotypage cfDNA	VAF	Thérapies ciblées (date de début de ttt)	Autres traitements	FDR et Devenir	M**
P18-210009	F	74	Carcinome épidermoïde T1bN2M1b	Del19 (c.2235_2249del)	27/01/2021	A	Del19	6 %	Tagrisso (mai 2020)	Chimio + pembro (sept 2020) Progression (dec 2020) RT (janv 2021)	Non-fumeuse + Solvants Décès mars 2023	ddPCR (Del19 et L858R)
P19-210011	F	67	ADK T2aN0M0	Del19 (c.2237_2255delinsT)	17/01/2019 18/07/2019 08/02/2021	R R R	Négatif NC Négatif	/ / /	Tarceva (oct 2017) Tagrisso (mars 2021)	Progression (fev 2021) RT pour progression (mars 2023)	Non-fumeuse	ddPCR (T790M et Del19)
P20-210020	F	90	ADK T3N2M1a	<i>MET</i> (c.2942-45_2942-22del)	16/03/2021	R	Négatif	/	∅	PEC palliative	Non-fumeuse Décès sept 2020	ddPCR (Del19 et L858R)
P21-210022	M	80	ADK T1cN2M1c	L858R (c.2573T>G)	20/04/2021	R	L858R	53 %	Tagrisso (juil 2020)	Progression (avril 2021) Chimio (mai 2021) Progression (janv 2022) RT puis PEC palliative (fev 2022)	Tabagisme sévère (8 PA) Décès février 2023	ddPCR (L858R et T790M)
P22-210023	F	79	ADK T4N3M1c	Del19 (c.2235_2249del)	31/05/2019 17/05/2021	A R	Del19 Négatif	/ /	Iressa (juil 2019) Tagrisso (Juil 2020)	Progression (mai 2020)	Non-fumeuse Décès le 12/08/2021	ddPCR (T790M et C797S)
P23-210031	F	74	ADK T4NxM1c	Ins Ex20 (c.2317delinsTACAACCCCT)	02/06/2021	A	Ins Ex20	7%	∅	RT Chimio	Tabagisme sévère (15 PA) K pulm frère et sœur Décès juillet 2021	qPCR
P24-210032-210075	M	80	Carcinome indifférencié T1N3M1a	L858R (c.2573T>G)	29/09/2020 04/06/2021	A R	Négatif L858R	/ 2%	Tagrisso (dec 2019)	RT (dec 2020) Chimio + pembro (janv 2021) Progression (dec, 2020, mai 2021, dec 2021, janv 2022°)	Tabagisme sévère (10 PA)	qPCR et ddPCR (L858R, Del19 et G12C)
P25-210037-220026	M	60	ADK T4N3M1a	G719A (c.2156G>C) + L861Q (c.2582T>A) + C797S (c.2390G>C)	25/09/2019 19/11/2019 10/02/2021 10/06/2021 24/11/2021 04/05/2022	A A A R R R	G719A Négatif Négatif Négatif Négatif Négatif	/ / / / / /	Tagrisso (sept 2019)	Progression (janv 2021, mars 2022, aout 2022°) Chimio (sept 2022)	Tabagisme sévère (25 PA) Décès aout 2020	ddPCR (C797S, T790M et Del19)

Annexe IV : suite 3

Patient	Sexe	Age*	Anatomopathologie	Génotypage intra tumoral	Date Prise de sang	Indication	Génotypage cfDNA	VAF	Thérapies ciblées (date de début de ttt)	Autres traitements	FDR et Devenir	M**
P26-210039	M	48	ADK T4N2M1a	Del19 (c.2235_2249del) + T790M (c.2369C>T) + C797S (c.2390G>C)	08/02/2017 28/05/2019 14/11/2019 15/06/2021	R R R R	Del Ex19 Del Ex19 + T790M/C797S Del Ex19 + T790M/C797S Del Ex19 + T790M	/ / / 7%/ 3%	Giotrif (2015) Tagrisso (janv 2018)	Progression (Janv 2018, avril 2019, fev 2020) RT (juil 2019) Chimio + bevacizumab (mars 2020) Chimio (mars 2021)	Non-fumeur	qPCR et ddPCR (T790M et C797S)
P27-210046	M	69	ADK T1N1M1c°	NC	26/07/2021	A	G719S (c.2155G>A)	3%	Tagrisso (sept 2021)	Chimio + pembro (juin 2021) Progressio (nov 2021) RT encéphalique Chimio + bevacizumab Progression (fev 2022°) RT encéphalique Chimio (juil 2022)	Tabagisme sevré (50 PA) + amiante	qPCR
P28-210053	F	58	ADK T4N1M1c°	Matériel insuffisant	24/08/2021	A	G719C (c.2155G>T)	3%	Tagrisso (sept 2021)	RT Chimio (juil 2022)	Tabagisme sevré (5 PA)	qPCR
P29-210063	F	75	ADK T4N2M1c°	L858R (c.2573T>G)	14/10/2021	A	L858R	30 %	Tagrisso (oct 2021)	RT	Non-fumeuse	ddPCR (L858R et C797S)
P30-220007	M	72	/	NC	15/02/2022	A	Négatif	/	/	/	/	qPCR
P31-220021-220033-220067	M	72	ADK TxNxM1b	L858R (c.2573T>G)	04/04/2022 03/06/2022 .././2022	A A /	L858R L858R + S768I (c.2303G>T) L858R	6% 8 % /	Tagrisso	/	Non-fumeur	qPCR et ddPCR
P32-220024	M	65	ADK T4N3M1a	Del19 (c.2240_2257del)	21/04/2022	R	Del19	23 %	Tagrisso (fev 2020)	Progression (mai 2022) Chimio (juin 2022)	Tabagisme sevré Décès janvier 2021	ddPCR (Del19 et C797S)
P33-220025	F	69	ADK T3N1M1c°	Del19 (/)	04/05/2022	R	Del19	3%	Tagrisso (janv 2020)	RT encéphalique (juil 2020, aout 2021) Progression (mai 2022, nov 2022) Chimio (juin 2022, nov 2022)	Non-fumeuse Décès juin 2022	qPCR et ddPCR (Del19 et C797S)
P34-220035	F	64	/	Del19 (c.2235_2249del)	11/07/2022	A	Del19	17 %	/	/	Décès octobre 2022	ddPCR (Del19 et G12C)

Annexe IV : suite 4

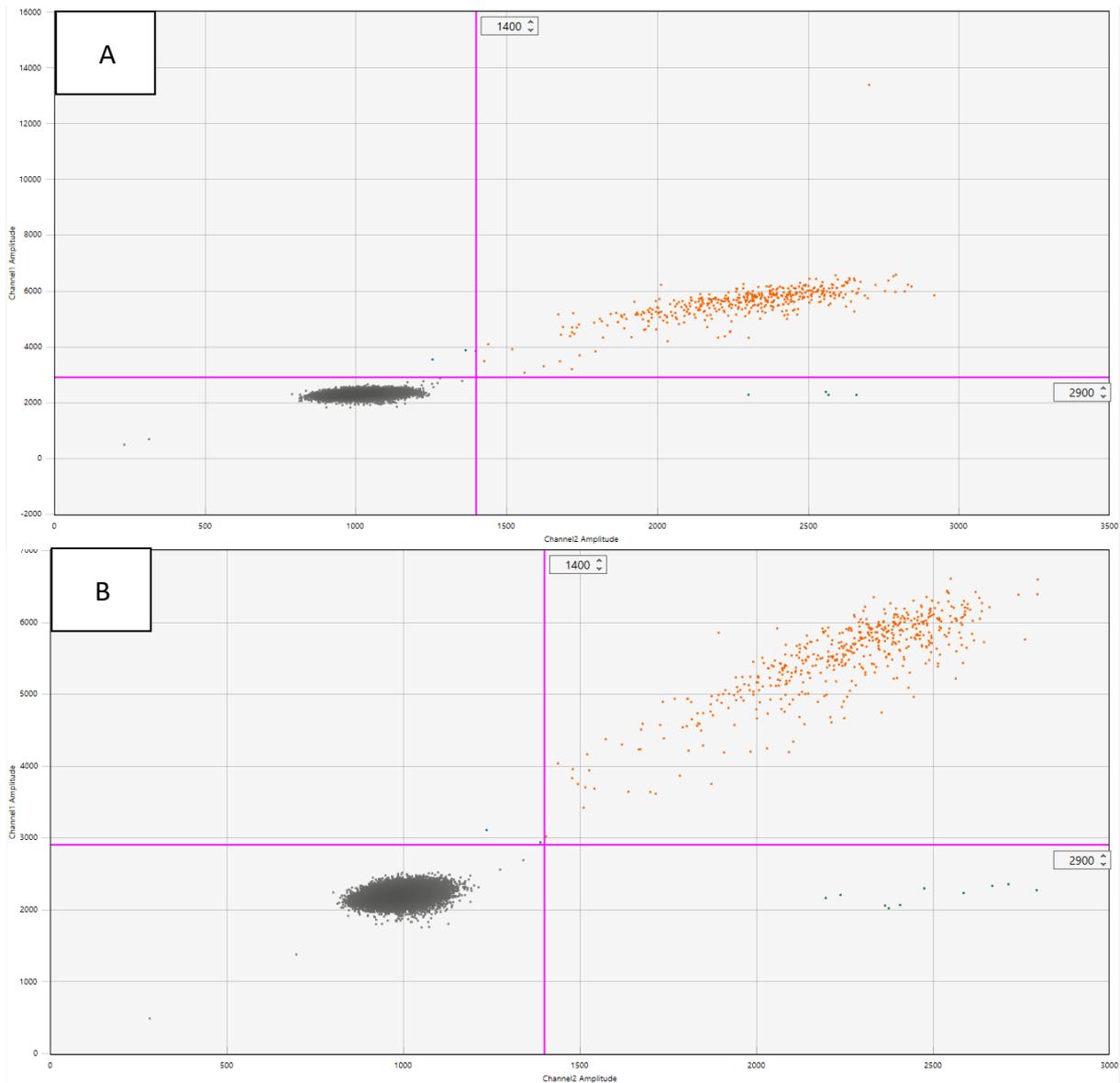
Patient	Sexe	Age*	Anatomopathologie	Génotypage intra tumoral	Date Prise de sang	Indication	Génotypage cfDNA	VAF	Thérapies ciblées (date de début de ttt)	Autres traitements	FDR et Devenir	M**
P35-220053	M	55	ADK TxNxM1c	G12C (c.34G>T)	14/10/2022	A	G12C	18 %	∅	RT	Tabagisme sévère (30 PA) Décès octobre 2020	ddPCR (G12C)
P36-220063	M	53	/	L858R (c.2573T>G)	10/12/2021 05/12/2022	R R	L858R + L718V (c.2152C>G) L858R	/ 1 %	/	/	/	ddPCR (L858R et T790M)

Annexe V : Détails des résultats comparatifs entre les techniques NGS Ion Torrent Ampliseq et ddPCR. P : positif, N : Négatif

*Echantillon passé en quadruplicats

L858R	NGS	ddPCR	Del19	NGS	ddPCR	T790M	NGS	ddPCR	C797S	NGS	ddPCR	G12C	NGS	ddPCR
200072	N	N	200059	N	N	200072	N	N	200059	N	N	200025	N	N
200072	N	N	200064	P	N	200072	N	N	200064	N	N	200025	N	N
200075*	N	N	200064	P	P	200083	N	N	200064	N	N	200093	N	N
200117	N	N	200075*	P	N	200093	P	P	200083	N	N	200117	N	N
200155	P	P	200156	P	P	200156	P	P	200155	N	N	200127	P	P
210009	N	N	200173	P	P	210007	N	N	210023	N	N	200127*	P	P
210009	N	N	210007	N	N	210011	N	N	210037	N	N	200148	N	N
210020	N	N	210007	N	N	210011	N	N	210037	N	N	200148	N	N
210022	P	P	210009	P	P	210022	N	N	210039	N	P	200173	N	N
210022	P	P	210009	P	P	210023	N	N	210063	N	N	210032	N	N
210032	P	P	210011	N	N	210037	N	N	210063	N	N	220035	N	N
210063	P	P	210020	N	N	210039	P	P	220024	N	N	220053	P	P
210075	P	P	210020	N	N	220048	N	N	220025	N	N	220053*	P	P
210075	P	P	210075	N	N	220048	N	N	220026	N	N	220067	N	N
220033	P	P	220024	P	P	220063	N	N	220033	N	N	220067	N	N
220048	N	N	220025	P	P									
220048	N	N	220026	N	N									
220063	P	P	220026	N	N									
220067	P	P	220035*	P	P									

Annexe VI : Distribution 2D des gouttelettes selon l'intensité de fluorescence pour l'échantillon 200064 qui est négatif lors de la première série (A) avec seulement 4 gouttelettes positives, et positif lors du second passage (B) avec 10 gouttelettes positives (p-value = 3.068×10^{-6}). Canal 1 : FAM, canal 2 : HEX.



Annexe VII : Détails des VAF obtenues pour les échantillons positifs par technique NGS Ion

Torrent Ampliseq et par ddPCR

L858R	NGS	ddPCR	Del19	NGS	ddPCR
200155	0,02	0,014	200064	0,01	0,0045
210022	0,53	0,528	200064	0,01	0,0106
210022	0,53	0,506	200075	0,03	0,0065
210032	0,02	0,036	200156	0,04	0,008
210063	0,3	0,317	200173	0,02	0,01149
210075	0,04	0,043	210009	0,06	0,03
210075	0,04	0,042	210009	0,06	0,035
220033	0,08	0,078	220024	0,23	0,196
220063	0,01	0,014	220025	0,03	0,85
220067	0,03	0,038	220035	0,17	0,081
CTRL	0,05	0,05346	CTRL	0,05	0,029
T790M	NGS	ddPCR	G12C	NGS	ddPCR
200093	0,02	0,032	200127	0,03	0,032
200156	0,01	0,025	200127	0,03	0,032
210039	0,03	0,03	220053	0,18	0,115
CTRL	0,05	0,047	220053	0,18	0,113
C797S	NGS	ddPCR			
210039	N	0.7%			

(Conseil national de l'ordre des médecins)

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.

Nom, Prénom

Signature

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette FACULTE et de mes chers CONDISCIPLES, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'Honneur et de la Probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et je n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

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

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

Nom, Prénom

Signature

Analyse de performances analytiques pour la détection non invasive des mutations activatrices et des mécanismes de résistance dans les cancers broncho-pulmonaires

Contexte : Le cancer bronchique non à petites cellules compte pour 85 % des cancers pulmonaires qui représentent la première cause de mortalité par cancer dans le monde. Il est plus fréquemment associé à des mutations somatiques activatrices, notamment dans le gène *EGFR*, qui permettent l'utilisation de thérapies ciblées chez les patients porteurs améliorant fortement la survie et la qualité de vie.

Objectif : Ce travail a pour but d'évaluer et comparer les performances analytiques de trois techniques de détection sur biopsie liquide des mutations activatrices du gène *EGFR* impliquées dans les cancers broncho-pulmonaires.

Méthodes : Des échantillons plasmatiques résiduels de patients ayant servi à la recherche de mutations somatiques au CHU de Brest ont été utilisés rétrospectivement pour tester la validité analytique et les performances diagnostiques de trois tests reposant respectivement sur le séquençage NGS (amplicon, technique de routine), la qPCR et la PCR digitale. Les tests ont ciblé les mutations les plus fréquentes d'*EGFR* (activatrices et de résistance) et une mutation courante dans *KRAS*. Le critère principal était la concordance des résultats qualitatifs entre ces techniques et la technique de référence utilisée à Brest.

Résultats : 43 échantillons issus de 36 patients ont été testés. La PCR digitale retrouve une concordance de 100 % pour trois des cinq mutations testées (L858R, T790M et G12C), un échantillon discordant revenant muté C797S quand la technique de référence le rend négatif et deux discordances pour les délétions de l'exon 19 où la mutation n'est pas détectée. Pour autant il n'y a pas de différence significative pour chacune des 5 mutations entre la PCR digitale et la référence (test de Fisher : p-value entre 0.74 et 1). Les résultats de qPCR étaient ambigus ce qui ne permettait pas leur interprétation.

Conclusion : Seule la PCR digitale a donné de bons résultats en améliorant la sensibilité analytique. La qPCR n'a pas donné de résultats satisfaisants car elle nécessite une quantité d'ADN trop importante, peu compatible avec les quantités et concentrations d'ADN tumoral circulant. La PCR digitale est intéressante et paraît adaptée pour une application en routine sur ADN circulant qui est un nouvel outil en plein développement.

Mots-clés :

- Cancer bronchique non à petites cellules
- Mutations activatrices
- Epithelial Growth Factor Receptor
- ADN tumoral circulant
- Thérapie ciblée