

Faculté de Médecine

Année 2019

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

le 29 mai 2019

Par Armand DUPIAS

Né(e) le 10 juillet 1988 à Dijon

Détermination des conditions pré analytiques et analytiques optimales pour la recherche des mutations d'EGFR sur l'ADN tumoral circulant dans les cancers pulmonaires

Thèse dirigée par Karine DURAND

Examineurs :

M. François Labrousse, Professeur des Universités, Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU de Limoges

M. Boris Melloni, Professeur des Universités, Pneumologie, CHU de Limoges

Mme Karine Durand, Maitre de Conférences des Universités, Biologie Cellulaire, CHU de Limoges

M. David Rizzo, Maitre de Conférences des Universités, Hématologie, CHU de Limoges

M. Prud'homme Romain, Chef de Clinique, Dermatologie, CHU de Limoges



Faculté de Médecine

Année 2019

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

le 29 mai 2019

Par Armand DUPIAS

Né(e) le 10 juillet 1988 à Dijon

Détermination des conditions pré analytiques et analytiques optimales pour la recherche des mutations d'EGFR sur l'ADN tumoral circulant dans les cancers pulmonaires

Thèse dirigée par Karine Durand

Examineurs :

M. François Labrousse, Professeur des Universités, Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU de Limoges

M. Boris Melloni, Professeur des Universités, Pneumologie, CHU de Limoges

Mme Karine Durand, Maître de Conférences des Universités, Biologie Cellulaire, CHU de Limoges

M. David Rizzo, Maître de Conférences des Universités, Hématologie, CHU de Limoges

M. Prud'homme Romain, Chef de Clinique, Dermatologie, CHU de Limoges



Professeurs des Universités - praticiens hospitaliers

Le 1^{er} septembre 2017

ABOYANS Victor	CARDIOLOGIE
ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
ARCHAMBEAUD Françoise	MEDECINE INTERNE (Surnombre jusqu'au 31-08-2020)
AUBARD Yves	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
AUBRY Karine	O.R.L.
BEDANE Christophe	DERMATO-VENEREOLOGIE
BERTIN Philippe	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre	O.R.L. (Surnombre jusqu'au 31-08-2018)
BORDESSOULE Dominique	HEMATOLOGIE (Surnombre jusqu'au 31-08-2018)
CAIRE François	NEUROCHIRURGIE
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE Pierre	RADIOTHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre	PSYCHIATRIE d'ADULTES
COGNE Michel	IMMUNOLOGIE
CORNU Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
COURATIER Philippe	NEUROLOGIE
DANTOINE Thierry	GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT
DARDE Marie-Laure	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
DESCAZEAUD Aurélien	UROLOGIE

DES GUETZ Gaëtan	CANCEROLOGIE
DESSPORT Jean-Claude	NUTRITION
DRUET-CABANAC Michel	MEDECINE et SANTE au TRAVAIL
DUMAS Jean-Philippe	UROLOGIE (Surnombre jusqu'au 31-08-2018)
DURAND-FONTANIER Sylvaine	ANATOMIE (CHIRURGIE DIGESTIVE)
ESSIG Marie	NEPHROLOGIE
FAUCHAIS Anne-Laure	MEDECINE INTERNE
FAUCHER Jean-François	MALADIES INFECTIEUSES
FAVREAU Frédéric	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
FEUILLARD Jean	HEMATOLOGIE
FOURCADE Laurent	CHIRURGIE INFANTILE
GAUTHIER Tristan	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
GUIGONIS Vincent	PEDIATRIE
JACCARD Arnaud	HEMATOLOGIE
JAUBERTEAU-MARCHAN M. Odile	IMMUNOLOGIE
LABROUSSE François	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LAROCHE Marie-Laure	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne	PEDIATRIE
LOUSTAUD-RATTI Véronique	HEPATOLOGIE
LY Kim	MEDECINE INTERNE
MABIT Christian	ANATOMIE
MAGY Laurent	NEUROLOGIE
MARIN Benoît	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE

MATHONNET Muriel	CHIRURGIE DIGESTIVE
MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE
MOHTY Dania	CARDIOLOGIE
MONTEIL Jacques	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
MOREAU Jean-Jacques	NEUROCHIRURGIE
MOUNAYER Charbel	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
NATHAN-DENIZOT Nathalie	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
NUBUKPO Philippe	ADDICTOLOGIE
PARAF François	MEDECINE LEGALE et DROIT de la SANTE
PLOY Marie-Cécile	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PREUX Pierre-Marie	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
ROBERT Pierre-Yves	OPHTALMOLOGIE
SALLE Jean-Yves	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
SAUTEREAU Denis	GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE
STURTZ Franck	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE et MALADIES METABOLIQUES
TREVES Richard	RHUMATOLOGIE
TUBIANA-MATHIEU Nicole	CANCEROLOGIE
VALLEIX Denis	ANATOMIE
VERGNENEGRE Alain	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
VERGNE-SALLE Pascale	THERAPEUTIQUE
VIGNON Philippe	REANIMATION
VINCENT François	PHYSIOLOGIE
WEINBRECK Pierre	MALADIES INFECTIEUSES
YARDIN Catherine	CYTOLOGIE et HISTOLOGIE

PROFESSEUR ASSOCIE DES UNIVERSITES A MI-TEMPS DES DISCIPLINES MEDICALES

BRIE Joël

CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AJZENBERG Daniel

PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE

BARRAUD Olivier

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

BOURTHOUMIEU Sylvie

CYTOLOGIE et HISTOLOGIE

BOUTEILLE Bernard

PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE

CHABLE Hélène

BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
(Retraite au 31-07-2018)

DURAND Karine

BIOLOGIE CELLULAIRE

ESCLAIRE Françoise

BIOLOGIE CELLULAIRE

HANTZ Sébastien

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

JACQUES Jérémie

GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE

JESUS Pierre

NUTRITION

LE GUYADER Alexandre

CHIRURGIE THORACIQUE et
CARDIOVASCULAIRE

LIA Anne-Sophie

BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE

MURAT Jean-Benjamin

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE

QUELVEN-BERTIN Isabelle

BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE

RIZZO David

HEMATOLOGIE

TCHALLA Achille

GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT

TERRO Faraj

BIOLOGIE CELLULAIRE

WOILLARD Jean-Baptiste

PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE

P.R.A.G.

GAUTIER Sylvie

ANGLAIS

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

BUCHON Daniel (Maintenu en fonction jusqu'au 31.08.2019)

DUMOITIER Nathalie (Responsable du département de Médecine Générale)

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS DE MEDECINE GENERALE

MENARD Dominique (du 1^{er} septembre 2016 au 12 janvier 2018)

PREVOST Martine (du 1^{er} septembre 2015 au 31 août 2018)

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS DE MEDECINE GENERALE

HOUDARD Gaëtan (du 1^{er} septembre 2016 au 31 août 2019)

LAUCHET Nadège (du 1^{er} septembre 2017 au 31 août 2020)

PAUTOUT-GUILLAUME Marie-Paule (du 1^{er} septembre 2015 au 31 août 2018)

PROFESSEURS EMERITES

ADENIS Jean-Paul du 01.09.2017 au 31.08.2019

ALDIGIER Jean-Claude du 01.09.2016 au 31.08.2018

BONNAUD François du 01.09.2017 au 31.08.2019

DE LUMLEY WOODYEAR Lionel du 01.09.2017 au 31.08.2019

DENIS François du 01.09.2017 au 31.08.2019

GAINANT Alain du 01.09.2017 au 31.08.2019

MERLE Louis du 01.09.2017 au 31.08.2019

MOULIES Dominique du 01.09.2015 au 31.08.2018

VALLAT Jean-Michel du 01.09.2014 au 31.08.2018

VIROT Patrice du 01.09.2016 au 31.08.2018

Assistants Hospitaliers Universitaires – Chefs de Clinique

Le 1^{er} novembre 2017

ASSISTANTS HOSPITALIERS UNIVERSITAIRES

BASTIEN Frédéric	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
BAUDRIER Fabien	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
CHARISSOUX Aurélie	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
CHARPENTIER Mathieu	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
DUCHESNE Mathilde	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
FAYE Pierre-Antoine	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
GAUTHIER François	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
KONG Mélody	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
LARRADET Matthieu	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE (Démission à compter du 1 ^{er} janvier 2018)
LEGRAS Claire	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION (Surnombre du 1 ^{er} novembre 2017 au 20 février 2018 inclus)
MARQUET Valentine	HISTOLOGIE, EMBRYOLOGIE et CYTOGENETIQUE

CHEFS DE CLINIQUE - ASSISTANTS DES HOPITAUX

AZAÏS Julie	MEDECINE INTERNE A
BAUDONNET Romain	OPHTALMOLOGIE
BIDAUT-GARNIER Mélanie	OPHTALMOLOGIE (A compter du 11 mai 2016)
BLOSSIER Jean-David	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
BOSETTI Anaïs	GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT
BOUKEFFA Nejma	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
BOUSQUET Pauline	PEDIATRIE (A compter du 09 janvier 2017)

CHAMPIGNY Marie-Alexandrine	PEDIATRIE
CHRISTOU Niki	CHIRURGIE DIGESTIVE
COLOMBIÉ Stéphanie	MEDECINE INTERNE A (A compter du 02 mai 2017)
COMPAGNAT Maxence	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
CROSSE Julien	PEDIATRIE
DANTHU Clément	NEPHROLOGIE
DARNIS Natacha	PEDOPSYCHIATRIE
DELUCHE Elise	CANCEROLOGIE
DE POUILLY-LACHATRE Anaïs	RHUMATOLOGIE (A compter du 02 mai 2017)
DIDOT Valérian	CARDIOLOGIE
DUSSAULT-JARLAN Lucile	CARDIOLOGIE
EVARD Bruno	REANIMATION
FAURE Bertrand	PSYCHIATRIE d'ADULTES
FAYEMENDY Charlotte	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
GARDIC Solène	UROLOGIE
GORDIENCO Alen	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE MEDECINE VASCULAIRE
GOUDELIN Marine	REANIMATION
HARDY Jérémy	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
KRETZSCHMAR Tristan	PSYCHIATRE d'ADULTES
LACHATRE Denis	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
LACOSTE Marie	MALADIES INFECTIEUSES
GSCHWIND Marion	MEDECINE INTERNE B
LAFON Thomas	MEDECINE d'URGENCE
LAHMADI Sanae	NEUROLOGIE

LATHIERE Thomas	OPHTALMOLOGIE
LEHMAN Lauriane	GASTROENTEROLOGIE
LEPETIT Hugo	GASTROENTEROLOGIE
MARGUERITTE François	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
MARTINS Elie	CARDIOLOGIE
PRUD'HOMME Romain	DERMATOLOGIE-VENERELOGIE
RAMIN Lionel	ORL
ROUCHAUD Aymeric	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE (NRI)
ROUSSELLET Olivier	NEUROLOGIE
SAINT PAUL Aude	PNEUMOLOGIE (Démission à compter du 23 décembre 2017)
SALLE Henri	NEUROCHIRURGIE
SANGLIER Florian	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
TAÏBI Abdelkader	ANATOMIE
USSEGLIO-GROSSO Julie	CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE et STOMATOLOGIE
VAYSSE VIC Mathieu	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
VITAL Pauline	MEDECINE INTERNE B
VITALE Gaetano	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE MEDECINE VASCULAIRE

CHEF DE CLINIQUE – MEDECINE GENERALE

DOIN Corinne

RUDELLE Karen

SEVE Léa

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

BALLOUHEY Quentin
CHIRURGIE INFANTILE
(du 1er mai 2015 au 30 avril 2019)

CROS Jérôme

ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
(du 1^{er} mai 2014 au 31 octobre 2018)

LERAT Justine

O.R.L. (du 1^{er} mai 2016 au 31 octobre 2020)

MATHIEU Pierre-Alain

CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et
TRAUMATOLOGIQUE
(du 1^{er} mai 2016 au 31 octobre 2020)

Remerciements

A mon chef de service, Mr Labrousse qui a toujours été bienveillant avec ses internes même pris par ses nombreuses attributions.

A ma directrice de thèse Karine, qui reste une personne extrêmement agréable et fun malgré la rigueur que lui impose le monde redoutable et en constante évolution de la biologie moléculaire. Malgré les prises de tête interminables sur le nombre de copie ou la LOD, j'ai pris plaisir à découvrir ce large éventail de techniques et toucher du doigt ces nouvelles technologies de pointes.

A ma femme : (Corinne DUPIAS, Dr DOIN) : merci d'être là dans tous les aspects de ma vie surtout quand je suis de mauvaise humeur. Je ne sais pas où on sera le mois prochain mais je sais que je t'aime*

*pour plus d'information se reporter à l'annexe Vœux de mariage.

Mon père : qui m'a transmis la logique, nécessaire tout au long des études de médecine.

Ainsi que le goût de l'effort physique qui m'oblige à gravir des montagnes.

Ma mère : qui m'a transmis la persévérance, cette force mentale sans laquelle toute cette logique n'aurait servi à rien, mais qui fait aussi que j'atteins le sommet des montagnes.

Ces deux-là sont le socle indispensable dans tous mes projets.

Mon frère : mon pote de toujours, avec qui on a toujours partagé les mêmes centres d'intérêts. Un jour, on arrivera à mener un de nos projets à terme. Tu sais Randy je ne te le dis pas souvent mais ... je dois y aller.

Ma sœur : la valeur sûre. Toujours motivée, toujours énergique, toujours sociable et toujours de bonne humeur* ! Elle vous suivra même dans les projets les plus fous les yeux fermés.

*qualificatif non contractuel

A mes beaux-parents (Michel et Elisabeth), les personnes les plus atypiques et attachantes que je connaisse. On vous rejoint sur Albi dans pas longtemps, on fera du drone pour s'approcher un peu plus de Dieu.

Aux enfants de Puycornet, Papi Adrien, Mamie Aline, Sabine, Patrick, Laurent, Frédéric, Nathalie, Emmanuelle, Pepe, Philomène*, Basile, Suzanne, Gabrielle, Antonin et Paolo, qui nous prouvent encore et toujours qu'il suffit d'une grange, d'un champ et de deux super grands parents à grande longévité pour passer les meilleurs moments.

*mention non contractuelle

A mes copains d'enfance, qui continuent d'être là malgré la distance,

Maxime : le sportif invétéré et bricoleur de génie. Il me prouve toujours plus que l'intelligence manuelle existe et m'embarque dans tous ces projets.

Yacine (le trader) : la tête pensante, il a bien vite fini dans la city de Londres mais a toujours su garder son humour acerbe qui m'a toujours fait rire.

Julien (le surfeur) : autrefois tourmenté il a aujourd'hui trouvé la sérénité qu'il transmet à tous au travers de ses cours de Yoga

Aux copains que j'ai piqué à mon frère,

Mathieu : le musicien qui suit la voie de la passion qu'on n'a pas eu le cran de suivre. On te regarde de loin avec fierté. J'espère qu'on sera amené à travailler sur d'autres projets ensemble dans les années à venir.

Paul (le renverseur de bière) : spécialiste Youtube, Romesh, Florent, Pierre

Au service d'anatomie pathologique de Limoges, tous les médecins qui m'ont transmis chacun un peu de leur savoir (Isabelle, Manu, Valère, François, Véro, Bema, Sophie, Mr Rougier, Jocelyne) tous les techniciens et techniciennes avec qui on a bien rigolé et parfois fait quelques bourdes (Karine, Elodie, Laura, Marie, Audrey, Fanny, Stéphanie, Damien, Benjamin, Angèle, Jade, Mathieu, Geoffrey, Pascale, Cédric, Kim, Annie, Nicole) toutes les secrétaires (Pascale, Joelle, Manon, Nadine, Juliette, Anne-marie), les techniciens de surface (Katia et Joe) et le showman pâtissier poète: l'inimitable Daniel.

Une mention spéciale pour mes anciennes co-internes, devenu chef

Anne : l'amie de longue date (bientôt 10 ans) toujours disponible et de bonne humeur avec laquelle nous avons partagé cette passion commune pour la voile. Tu es exceptionnelle en tant que chef.

Aurélie : sûrement le médecin la plus précise, rigoureuse et efficace. Mais derrière la machine, il y a aussi beaucoup de tendresse je le sais.

Les Thugs (Maître Mathilde, Fabrice dit « ProjeTiX » et Tesla) : ils cultivent un savant mélange de classe et de wesh qui en fait des boloss très attachants.

Une mention toute particulière pour le laboratoire d'anatomie pathologique de Brive-la-Gaillarde qui m'a permis d'avoir une formation accélérée et de me sentir à l'aise en activité de remplacement. La disponibilité et la compétence des médecins (Caroline, Laura et Marie) en font le stage de choix sur notre maquette. Merci aussi à toutes les techniciennes et secrétaires et au technicien sur place pour leur accueil chaleureux.

A mes co internes,

Camille (Guibertie) : pour son aide précieuse sur ce travail de thèse, ses imitations (on lâche rien !) et CAAAAAGGGIIITTEEEs. Tu gères

Maverick (Bertrand) : c'est le soufflant le plus puissant sur terre. Merci pour tous ces avis sur des cas où « même si c'est écrit noir sur blanc dans l'OMS, on n'avait pas les billes et on ne pouvait pas signer ça parce qu'à moment donné on a l'anapath qu'on mérite ». On formait un sacré duo coéquipier.

Emeline : pour toutes tes blagues qui me manqueront

Antonio : le gitan spécialisé dans la maladie de Wilson (le cuivre !)

Raphael : la relève bien en place, le papa avec son CDI !

A mes co-internes des débuts en néphrologie Zora et Julien, on se sera bien amusé sur ce premier semestre avec Chambaraud et Rerolle entre duel au NO et concours de lever de jambe.

Aux copains d'externat, qu'on ne voit plus assez : Géraldine, William, Guillaume et Laura.

Aux colocs,

Benji (super saiyan) : le roi du repas coloc avec magret de canard, friton de canard, cuisse de canard ..et sushi. Merci pour l'approvisionnement en alcool.

Quentin (le casse coup) : 4 x 4, boxe, kite surf, feu de camp, ski, jerrican, wake, franchissement. Il ne s'arrête jamais même pas sur un 72 km !

Mathieu (la force tranquille) : merci de t'être contraint à visiter la nouvelle Calédonie pour me prêter ta chambre comme bureau

PA (le monacal) : après une violente fracture de l'estime de soi en VTT, il entre dans les ordres

Manon : ça me fait plaisir qu'on ait une deuxième fille officiellement à la maison et en plus tu utilises mes techniques de cuisson pour tes tartes

Marouschka : son enrobage de douceur cache un cœur de badass qui aspire à débiter du sapin

Camille : tu as l'air bien remise de ta fracture

Thibault (hein) : je suis le seul à tondre depuis ton départ. Mais elles sont où les perceuses ?

Aux copains d'internat,

Erwan (Minasse) : lui aussi de sang bleu, ces vœux sont, après avoir été baptisé dans le vin, d'être crucifié sur l'internat

Amandine (Boulard), Marie (Nièrè) et Camille (la plutonienne)

Aux copains de ski et de BTP, Louis et ses croisés, Sarah, Mathieu et ses gins tooo, PH et ses dérapage incontrôlés, Claire, Thomas et Clo latino.

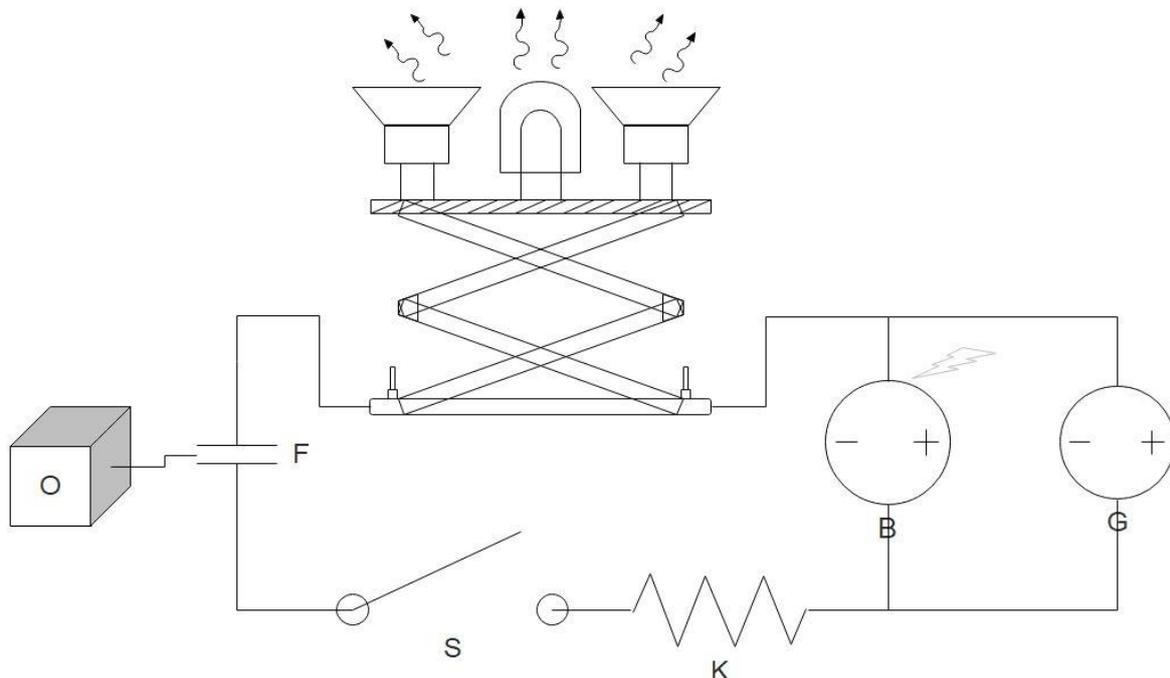


Tableau 1' Circuit électrique de dérivation alimenté en courant continu

Interrupteur (Romain dit le Sublime) : s'apparentant en fait plus à un détonateur ou un interrupteur fermé en permanence, il est très prisé dans le domaine de la composition pyrotechnique. Sa rapidité d'exécution fait qu'il est le seul composant utilisable à l'heure actuelle dans les expériences de sublimation*. Il fut le premier élément à l'initiation de ce projet global dont les implications sont aujourd'hui majeures.

*passage d'un corps de l'état solide à l'état gazeux, sans passer par l'état liquide

Pile (Bertrand dit Beber) : élément indispensable de tout circuit électrique, il est essentiel pour produire toujours plus de sons de qualité. Ce composant reste tout de même chargé en substance toxique. Des problèmes de court jus, nous ont fait suspecter une fragilité intrinsèque au niveau de cet élément.

Nouvelle pile (Géraud dit Gégé) : suite au problème de court jus de notre pile, nous nous sommes dotés d'une pile de nouvelle génération plus efficace et plus compacte. Mais aussi plus fragile ! Les premiers essais ont été compliqués avec de nombreux dégâts à déplorer sur la plateforme de Guéret.

Résistance (Kilian dit le Kill) : fabriqué dans des matériaux d'origine cantalienne comme le laisse présager son important gabarit (on notera cependant un effort du constructeur sur le plan du poids), il est d'un équivalent 3 Ohm. Ce composant est fait pour durer et il ne vous lâchera pas quel que soit les montages ou projets même les plus fous que vous entreprendrez.

Condensateur (Romain Favier dit la Fave) : capable d'accumuler sur des périodes pouvant aller jusqu'à plusieurs mois, il délivre une décharge rapide et massive. Tant est si bien que pour contrôler cette dernière, il nous a fallu le doter d'un calculateur.

Processeur Orion 49 (Baptiste) : produit à Angers, ce calculateur est désormais indissociable du condensateur avec lequel il délivre des décharges sonores aux quatre coins de la France.

Facteur π (Alex 3,14) : Le nombre π (de l'anglais P2/D1) est irrationnel, c'est-à-dire qu'on ne peut pas l'exprimer comme un rapport de deux nombres entiers. C'est même un nombre transcendant qui fût déjà utilisé sur le système plus ancien dit de « La Chabroulie » de notre concurrent direct. Il nous a permis de démultiplier la puissance de notre circuit.

Même si la mondialisation va nous obliger à décomposer la production entre Paris, Limoges, Albi et la Suisse, j'espère que nous parviendrons toujours à rassembler les différents composés pour des sessions clean.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Introduction	25
I. Généralités.....	26
I.1. Le cancer pulmonaire.....	26
I.1.1. Epidémiologie et histologie	26
I.1.1.1. Adénocarcinome	26
I.1.1.2. Carcinome épidermoïde	28
I.1.1.3. Carcinome à petites cellules	29
I.1.1.4. Carcinome à grandes cellules	31
I.1.1.5. Classification TNM	31
I.1.2. Altérations moléculaires des cancers broncho-pulmonaires	32
I.1.2.1. Gènes codant pour les récepteurs à activité tyrosine kinase	33
I.1.2.2. Gènes codant pour les protéines de la voie PIK3CA/AKT et MAPKinases	35
I.1.2.3. Inhibiteurs des checkpoints : marqueurs de réponse à l'immunothérapie PDL-1	36
I.1.3. Traitement	37
I.2. EGFR.....	40
I.2.1. Caractéristiques	40
I.2.2. EGFR : mutations activatrices et de résistances aux TKI de 1 ^{ère} et 2 ^{ème} génération	41
I.2.3. EGFR : mutations activatrices et de résistances aux TKI 3 ^{ème} génération.....	43
I.2.4. Autres mécanismes de résistance aux ITK.....	43
I.2.4.1. Facteurs de résistance réactivant les voies de signalisation.....	44
I.2.4.2. Changement de phénotype histologique et transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)	45
I.3. Biopsies liquides	45
I.3.1.1. Intérêt, principes et natures des biopsies liquides	45
I.3.2. Cas particulier de l'ADN tumoral circulant.....	48
I.3.2.1. Phase pré-analytique	50
I.3.2.2. Phase analytique.....	51
II. Objectif	55
III. Matériels et méthodes	56
III.1. Comparaison des performances des tubes de prélèvements EDTA et Roche.....	56
III.1.1. Prélèvements des échantillons sanguins	56
III.1.2. Obtention et ajout de l'allèle <i>EGFR</i> muté	56
III.1.2.1. Obtention d'amplicons <i>EGFR</i> comportant les mutations L858R et T790M à partir de la lignée cellulaire NCI-H1975.....	56
III.1.2.2. Constitution des échantillons artificiels par ajout de l'allèle muté dans les prélèvements sanguins	60
III.1.3. Récupération du plasma.....	62
III.1.4. Génétique moléculaire.....	63
III.2. Comparaison de la sensibilité et de la spécificité des méthodes d'analyses.....	65
III.2.1. Standards de référence commerciaux	65
III.2.2. Analyse par ARMS (Therascreen)	65
III.2.3. Analyse par qPCR (Cobas)	68
III.2.4. Analyse par séquençage-haut-débit (NGS)	69

III.2.4.1. Préparation des librairies.....	69
III.2.4.1.1. Panel NGS Colon Lung Cancer	70
III.2.4.1.2. Panel Oncomine Lung cfDNA	72
III.2.4.2. Réaction d'amplification clonale par PCR en émulsion.....	76
III.2.4.3. Chargement de la puce et réaction de séquençage	77
III.2.4.4. Analyse bio-informatique des données.....	78
III.2.4.4.1. Outils de filtration des données brutes	78
III.2.4.4.2. Traitement des données	78
III.2.5. Analyse par ddPCR (Droplet Digital PCR)	79
III.2.5.1. Principe.....	79
III.2.5.2. Protocole.....	80
III.3. Etude rétrospective par ddPCR de biopsies liquides et tissulaires	82
III.3.1. Données cliniques, histopathologiques et biologiques	82
III.3.2. Analyse moléculaire	83
III.3.2.1. Biopsies liquides	83
III.3.2.2. Biopsies tissulaires.....	83
IV. Résultats.....	85
IV.1. Comparaison des performances des tubes de prélèvements EDTA et Roche	85
IV.2. Comparaison de la sensibilité et de la spécificité des méthodes d'analyse	87
IV.2.1. Analyse par ARMS (Therascreen).....	87
IV.2.2. Analyse par qPCR par la méthode CE/IVD cobas® EGFR Mutation Test v2.....	89
IV.2.3. Analyse par NGS	91
IV.2.3.1. Panel Colon Lung	91
IV.2.3.2. Panel Oncomine	93
IV.2.4. Analyse par ddPCR.....	95
IV.2.4.1. Limite de détection (LoD).....	95
IV.2.4.2. Résultats.....	96
IV.2.4.3. Calcul du nombre de copies dans l'échantillon initial	99
IV.2.5. Comparaison de la sensibilité des techniques	101
IV.3. Etude rétrospective par ddPCR sur biopsies liquides et tissulaires	102
IV.3.1. Données cliniques.....	102
IV.3.2. Données histopathologiques	103
IV.3.3. Données biologiques.....	106
IV.3.4. Analyses par ddPCR	106
IV.3.4.1. Biopsies liquides	106
IV.3.4.2. Biopsies tissulaires	107
V. Discussion	108
V.1. Comparaison des performances des tubes de prélèvements EDTA et Roche	108
V.2. Comparaison de la sensibilité et de la spécificité des méthodes d'analyses	109
V.3. Etude rétrospective par ddPCR sur biopsies liquides et tissulaires initialement négatives pour la mutation T790M chez 10 patients.	111
Conclusion	116
Références bibliographiques	117
Annexes	131
Serment d'Hippocrate.....	134

Table des illustrations

Figure 1 Adénocarcinome pulmonaire de type tubuleux, HES x 200 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).	27
Figure 2 Coloration au Bleu Alcian mettant en évidence une sécrétion de mucine intracellulaire dans un adénocarcinome tubuleux, x 200 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).	27
Figure 3 Immunohistochimie par anticorps anti-TTF1 dans un adénocarcinome pulmonaire, x 100 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).	28
Figure 4 Carcinome épidermoïde, HES x 100 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).	29
Figure 5 Carcinome à petites cellules, HES x 50 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).	30
Figure 6 Immunohistochimie par anticorps anti-NCAM dans un carcinome à petites cellules, x 50 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).	30
Figure 7 Carcinome à grandes cellules, x 100 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).	31
Figure 8 Fréquence des altérations génétiques dans les adénocarcinomes pulmonaires (6)	33
Figure 9 Représentation schématique des interactions du lymphocyte T dans le checkpoint immunitaire et effets des principaux anticorps monoclonaux (37)	37
Figure 10 Représentation schématique du récepteur de l'Epidermal Growth Factor (EGFR) et des voies de signalisation sous-jacentes, ainsi que du mécanisme d'action de quelques molécules thérapeutiques capables d'inhiber ces mécanismes (cetuximab = anti-EGFR ; gefitinib et erlotinib = inhibiteurs de tyrosine kinase) (51).....	41
Figure 11 Représentation schématique des mutations principales d' <i>EGFR</i> constituant une indication de traitement par ITK (59).....	42
Figure 12 Fréquence relative des différents mécanismes de résistance acquise aux ITK (71).	44
Figure 13 Différentes cibles des biopsies liquides et leur utilisation pour les différentes phases de la prise en charge clinique (94)	47
Figure 14 Origine des acides nucléiques circulants et types d'altérations retrouvées (114)..	49
Figure 15 Comparaison des applications des marqueurs sériques tumoraux (côlon : ACE, sein : CA15.3, prostate : PSA, ovaire : CA125, testicule : hCG, thyroïde : Tg) et de l'ADN tumoral circulant (115).....	50
Figure 16 Comparaison du pourcentage d'allèle muté nécessaire pour avoir une sensibilité et une spécificité suffisante des techniques de détection (113).	52
Figure 17 Séquence des fragments d' <i>EGFR</i> contenant les mutations L858R et T790M.....	58
Figure 18 Protocole de comparaison des performances de conservation des tubes EDTA et Roche.....	62
Figure 19 Séquence de dispensation (injection) et d'analyse (K = G ou T ; D = A, G ou T) ..	65

Figure 20 Amplification spécifique d'allèle par ARMS avec sondes Scorpions(145)	66
Figure 21 Mécanisme de fonctionnement d'une sonde Scorpion.	67
Figure 22 Fonctionnement des sondes d'hydrolyse (système Taqman®).....	68
Figure 23 Préparation des bibliothèques d'amplicon Ion torrent(149).....	70
Figure 24 Identifiants moléculaires uniques permettant de marquer individuellement chaque molécule d'ADN avant amplification.	73
Figure 25 Profil Agilent initial	75
Figure 26 Profils Agilent pour les 4 standards DNA Horizon avec les tailles de pics attendus aux alentours de 220pb (flèches rouges).....	76
Figure 27 Avantages du partitionnement dans les dosages numériques. (A) augmentation de la concentration efficace et (B) effet d'enrichissement, c'est-à-dire réduction des composés interférents comme par exemple l'ADNg non muté (153).....	79
Figure 28 Comparaison des dosages numériques et des dosages biologiques analogiques conventionnels (153).	80
Figure 29 Caractéristique des sondes Taqman® EGFR T790M DPCR (158).....	81
Figure 30 Cartouche DG8™ de génération des gouttelettes.....	81
Figure 31 Pyrogrammes des témoins négatif et positif de la mutation <i>EGFR</i> L858R. Le témoin positif correspond à de l'ADN génomique extrait de cellules H1975 présentant une triploïdie, soit deux copies d'allèle <i>EGFR</i> muté L858R et une copie d'allèle sauvage, visualisables sur le pyrogramme par des fréquences alléliques de 66% et 33% respectivement.	85
Figure 32 Pyrogrammes des différents profils de détection observés. Le triplet de nucléotides CTG correspondant à la leucine 858 est encadré en rouge	86
Figure 33 Fréquence allélique moyenne de la mutation L858R détectée par pyroséquençage en fonction du temps de conservation des tubes.	87
Figure 34 Courbes d'amplification pour la mutation <i>EGFR</i> L858R par la technique ARMS (Therascreen).....	88
Figure 35 Courbes d'amplification pour la mutation <i>EGFR</i> T790M par la technique ARMS (Therascreen).....	88
Figure 36 Résultats de l'analyse de 24 réplicats de contrôle négatif à 20 ng (Nombre d'évènement ou gouttelette sauvage en vert et muté le long de l'axe des abscisse).....	95
Figure 37 Résultat ddPCR pour le cfDNA sans mutation (sauvage ou WT). Seuils (violet), Gouttelette négatives pour la séquence d'intérêt (noir). Gouttelette contenant une séquence d'intérêt sauvage (vert).....	97
Figure 38 Résultat ddPCR cfDNA Horizon 0,1 %. Seuils (violet), Gouttelette négatives pour la séquence d'intérêt (noir). Gouttelette contenant une séquence d'intérêt sauvage (vert). Gouttelette contenant une séquence d'intérêt mutée T790M (bleu). Gouttelette contenant des séquences sauvage et muté T790M (orange).....	97
Figure 39 Résultat ddPCR cfDNA Horizon 1 %. Seuils (violet), Gouttelette négatives pour la séquence d'intérêt (noir). Gouttelette contenant une séquence d'intérêt sauvage (vert).	

Gouttelette contenant une séquence d'intérêt mutée T790M (bleu). Gouttelette contenant des séquences sauvage et muté T790M (orange).....	98
Figure 40 Résultat ddPCR cfDNA Horizon 5 %. Seuils (violet), Gouttelette négatives pour la séquence d'intérêt (noir). Gouttelette contenant une séquence d'intérêt sauvage (vert). Gouttelette contenant une séquence d'intérêt mutée T790M (bleu). Gouttelette contenant des séquences sauvage et muté T790M (orange).....	98
Figure 41 Résultats en nombres d'évènements Sauvage et Muté T790M par échantillons pour la manipulation 1.	99
Figure 42 Résultats en nombres d'évènements Sauvage et Muté T790M par échantillons pour la manipulation 2.	99
Figure 43 Estimation du nombre de copies par la loi de Poisson.....	100
Figure 44 Résultats en nombre de copies mutées et sauvages par μ L pour la manipulation 1.	100
Figure 45 Cytologie pleurale d'un adénocarcinome pulmonaire, Giemsa x 100 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).	104
Figure 46 Carcinome mixte avec composante adénocarcinomateuse de type lépidique (à gauche) et composante de type carcinome à petites cellules (à droite). Coloration HES x 100 (A). Immunohistochimie avec anticorps anti-NCAM (B) (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).	105
Figure 47 Artefacts secondaires à la mauvaise qualité d'un échantillon.....	112
Figure 48 Sensibilité maximale théorique de la ddPCR Biorad en fréquence allélique de la ddPCR en fonction de la quantité d'ADN (176).....	112
Figure 49 Perspectives thérapeutiques dans les tumeurs résistantes au ITK de 3 ^{ème} génération (181).....	114

Table des tableaux

Tableau 1 Stade de la 8 ^{ème} édition de la classification TNM du poumon (4).....	32
Tableau 2 Inhibiteurs de tyrosine kinase autorisés par l'Agence Européenne de Médecine dans les CBNPC (46)	39
Tableau 3 Anticorps monoclonaux autorisés par l'Agence Européenne de Médecine dans les CBNPC.....	40
Tableau 4 Design des amorces PCR pour l'amplification des séquences contenant les mutations L858R et T790M des exons 21 et 20 d' <i>EGFR</i> respectivement.	57
Tableau 5. Calcul du nombre de copies <i>EGFR</i> mutés exon 21 L858R et exon 20 T790M dans le produit PCR.	59
Tableau 6 Dilutions des fragments <i>EGFR</i> mutés L858R et T790M.....	60
Tableau 7 Calcul du nombre de copies <i>EGFR</i> apportées au cours d'un pyroséquencage	61
Tableau 8 Fréquences alléliques attendues pour les Multiplex I cfDNA Reference Standards à 5%, 1%, 0,1% et 100% Wild Type par PCR digitale(144).	65
Tableau 9 Fréquences alléliques de la mutation L858R détectées dans l'ADNtc.....	86
Tableau 10 Résultats ARMS Therascreen exprimés en C _t (Cycle Threshold) en fonction de la mutation recherchée et de sa fréquence allélique. Nd : Non détecté	89
Tableau 11 Résultats qPCR Cobas (1 ^{ère} manipulation).....	90
Tableau 12 Résultats qPCR Cobas (2 ^{ème} manipulation)	90
Tableau 13 Résultats NGS Colon Lung pour les mutations d' <i>EGFR</i> exprimés en fréquence allélique(%). Nd : non détecté.....	91
Tableau 14 Résultats NGS Colon Lung pour les autres mutations présentes dans les témoins cfDNA Horizon exprimés en fréquence allélique (%). Nd : non détecté	92
Tableau 15 Fréquence allélique des autres mutations retrouvées	92
Tableau 16 Résultats NGS Oncomine pour les mutations d' <i>EGFR</i> exprimés en fréquence allélique (%). Nd : non détecté.....	93
Tableau 17 Résultats NGS Oncomine pour les autres mutations présentes dans les témoins cfDNA Horizon (Fréquence allélique %). Nd : non détecté.....	94
Tableau 18 Fréquence allélique des autres mutations retrouvées	94
Tableau 19 Fréquences alléliques détectées par ddPCR pour les 4 témoins cfDNA horizon (%)	101
Tableau 20 Sensibilité des différentes techniques pour la détection de la mutation L858R.	101
Tableau 21 Sensibilité des différentes techniques pour la détection de la mutation T790M	102
Tableau 22 Principales données cliniques, histopathologiques et biologiques des patients	103
Tableau 23 Résultats de l'analyse de T790M par ddPCR sur les plasmas.	107
Tableau 24 Résultats de l'analyse de T790M par ddPCR sur les biopsies tissulaires.	107

Abréviations

ADN : acide désoxy-ribo-nucléique

ADNg: ADN génomique

ADNtc : ADN tumoral circulant

ARMS : Amplification Refractory Mutation System (système d'amplification réfractaire de mutation)

BAM : Binary Alignment Map (carte d'alignement binaire)

CBNPC : cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules

CT : cycle threshold (seuil de cycle)

CTCs : cellules tumorales circulantes

ddPCR : droplet digital PCR (PCR digitale en gouttelette)

dNTP : désoxyribonucléotides triphosphate

dPCR : PCR digitale

EGFR : Epidermal growth factor receptor (récepteur du facteur de croissance épidermique)

FFPE : Formalin-fixed, Paraffin-embedded (Fixé au formol, inclus en paraffine)

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization (hybridation in situ en fluorescence)

HES : Hématoxyline Eosine Safran

IHC: Immunohistochimie

L858R : p.Leu858Arg

LOD: Limit of Detection (limite de détection)

MiARN : micro acide ribo-nucléique

NGS: Next Generation Sequencing (séquençage nouvelle génération)

PCR : polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

PGMC : Plateforme de Génétique Moléculaire du Cancer

pb : paire de base

qPCR : PCR quantitative ou PCR en temps réel

T790M : p.Thr790Met

TNM : Classification des tumeurs malignes (Tumor, lymph Nodes, Metastasis)

uBAM : unmapped BAM

UID: unique identifier (identifiant unique)

UMI: unique molecular identifiers (identifiant moléculaire unique)

ITK : Inhibiteur de tyrosine kinase

IVD : In Vitro Diagnostic

WT : wild-type (sauvage)

Introduction

La recherche de mutations du gène *EGFR* est aujourd'hui un point clé du diagnostic et de la prise en charge des adénocarcinomes broncho-pulmonaires localement avancés et métastatiques puisqu'elle détermine la décision thérapeutique de première et deuxième ligne avec notamment la prescription d'inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) en cas de mutation activatrice. L'apparition de mutations de résistance du gène *EGFR*, consécutive au traitement par ITK, nécessite de réaliser des prélèvements à récidive pour rechercher un changement dans le génotype et le phénotype tumoraux. Dans ce contexte, les prélèvements par biopsies liquides destinés à la recherche de mutations sur l'ADN tumoral circulant (ADNtc) dans le sang des patients présentent l'avantage d'éviter des gestes invasifs répétés et ont connu un essor considérable ces dernières années.

Du fait de la faible quantité de matériel génétique tumoral circulant, la recherche de mutations sur l'ADNtc nécessite des conditions pré-analytiques contrôlées, standardisées et des techniques analytiques très sensibles. Dans cet objectif, nous avons comparé différentes méthodes pré-analytiques et analytiques. Le rendement et la sensibilité de ces méthodes ont été comparés au moyen de standards de références commerciaux. La méthode déterminée comme la plus sensible a été utilisée pour analyser les biopsies liquides de patients ayant récidivés sous ITK, déjà analysées et donc disponibles au laboratoire, et pour lesquels a été détectée une mutation activatrice mais aucune mutation de résistance. Enfin, les biopsies tissulaires initiales correspondantes avant traitement ont été analysées par la même technique afin de savoir si la mutation de résistance était présente initialement mais non détectée à cause d'un manque de sensibilité de la technique de routine utilisée à ce moment-là.

Les conditions pré-analytiques mises au point dans ce contexte pourront être appliquées à l'ensemble des recherches de mutations dans les biopsies liquides à effectuer à l'avenir en routine, ceci quelle que soit la mutation recherchée (autres mutations *EGFR*, mutations *ALK*, *KRAS*, *BRAF*, etc.), le moment de la prise en charge (avant traitement ou à récidive) et la pathologie (cancers pulmonaires, colorectaux, mélanomes, etc.).

I. Généralités

I.1. Le cancer pulmonaire

I.1.1. Epidémiologie et histologie

Le cancer du poumon en France constitue le second cancer en termes de fréquence chez l'homme et le troisième chez la femme. Il représente la première cause de décès par cancer chez l'homme et la deuxième chez la femme (1).

La classification OMS 2015 des tumeurs du poumon (2) définit les types histologiques suivants, par ordre de fréquence :

I.1.1.1. Adénocarcinome

L'adénocarcinome représente le type histologique prédominant avec une proportion en augmentation estimée à plus 40 % des cancers broncho-pulmonaires entre 2006 et 2010. L'adénocarcinome infiltrant correspond à une prolifération épithéliale maligne avec une différenciation glandulaire, la production de mucine (Figure 2) ou une expression du marqueur des pneumocytes TTF1 (Figure 3), exprimé dans 75% des cas. La tumeur peut présenter une architecture tubuleuse (Figure 1), papillaire, micropapillaire, lépidique ou solide. Le sous type histologique est défini en fonction de l'architecture prédominante.

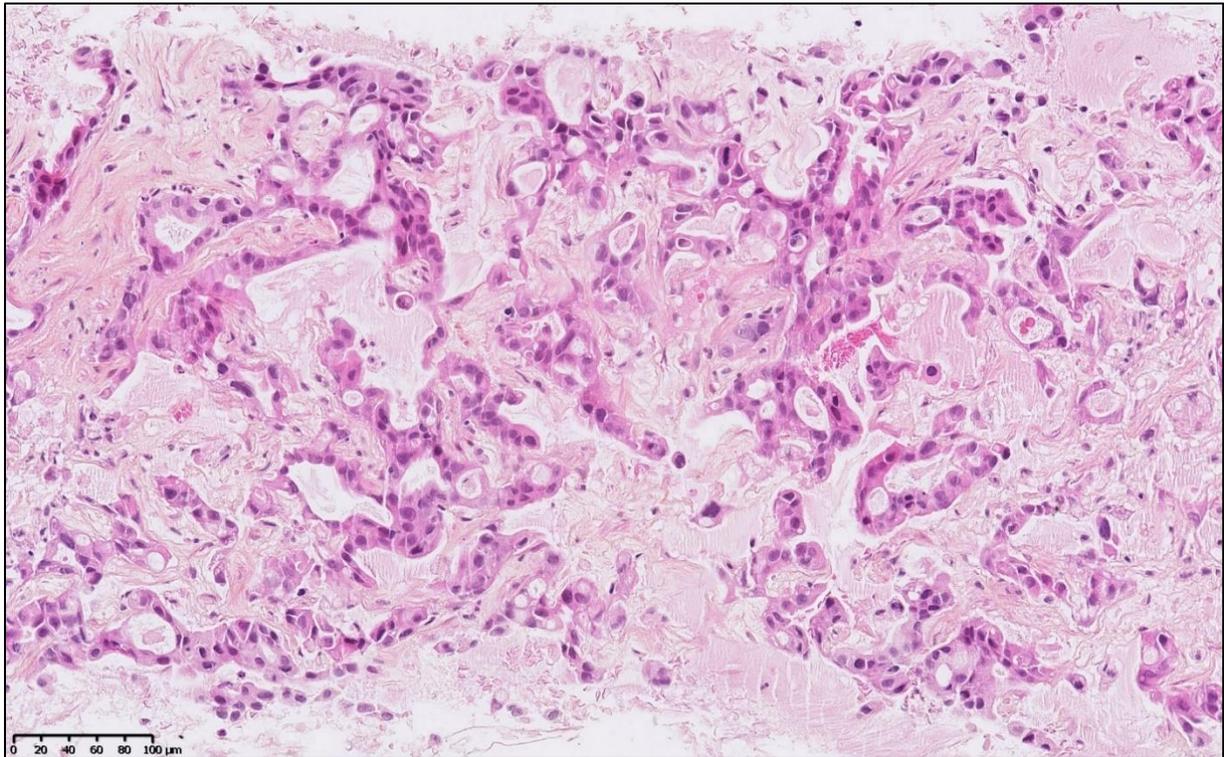


Figure 1 Adénocarcinome pulmonaire de type tubuleux, HES x 200 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

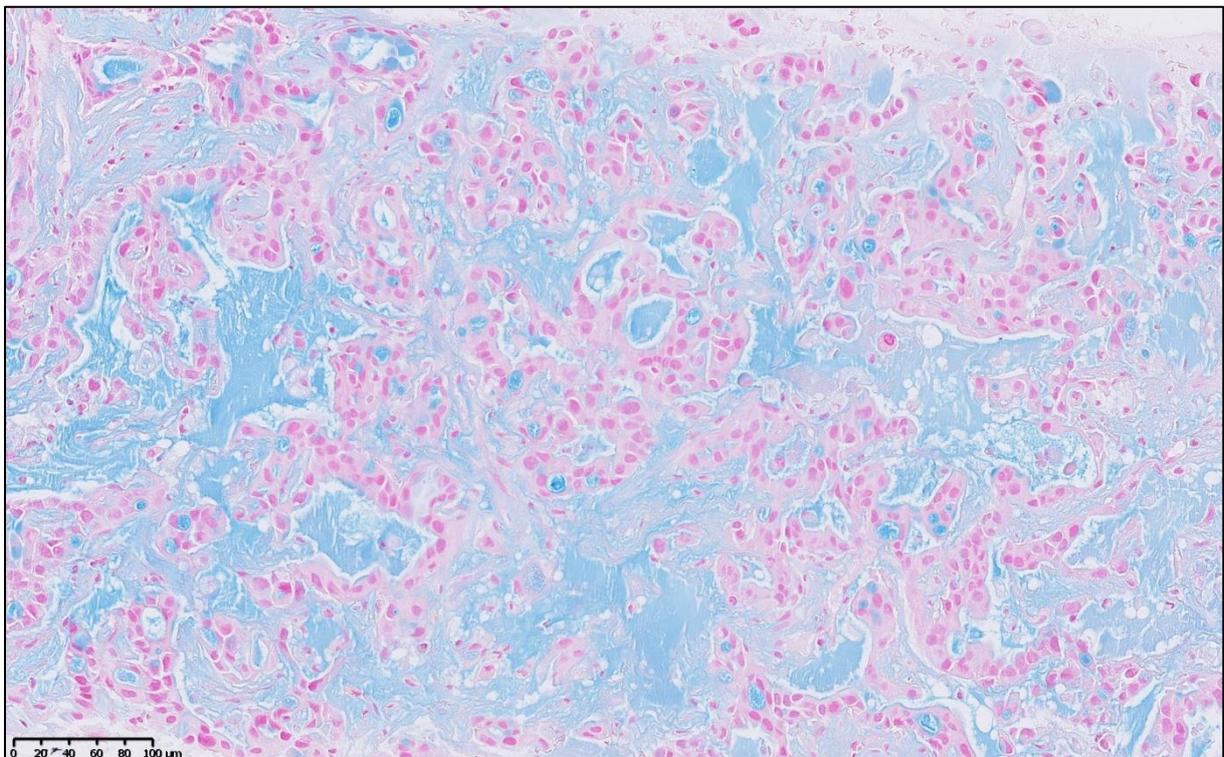


Figure 2 Coloration au Bleu Alcian mettant en évidence une sécrétion de mucine intracellulaire dans un adénocarcinome tubuleux, x 200 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

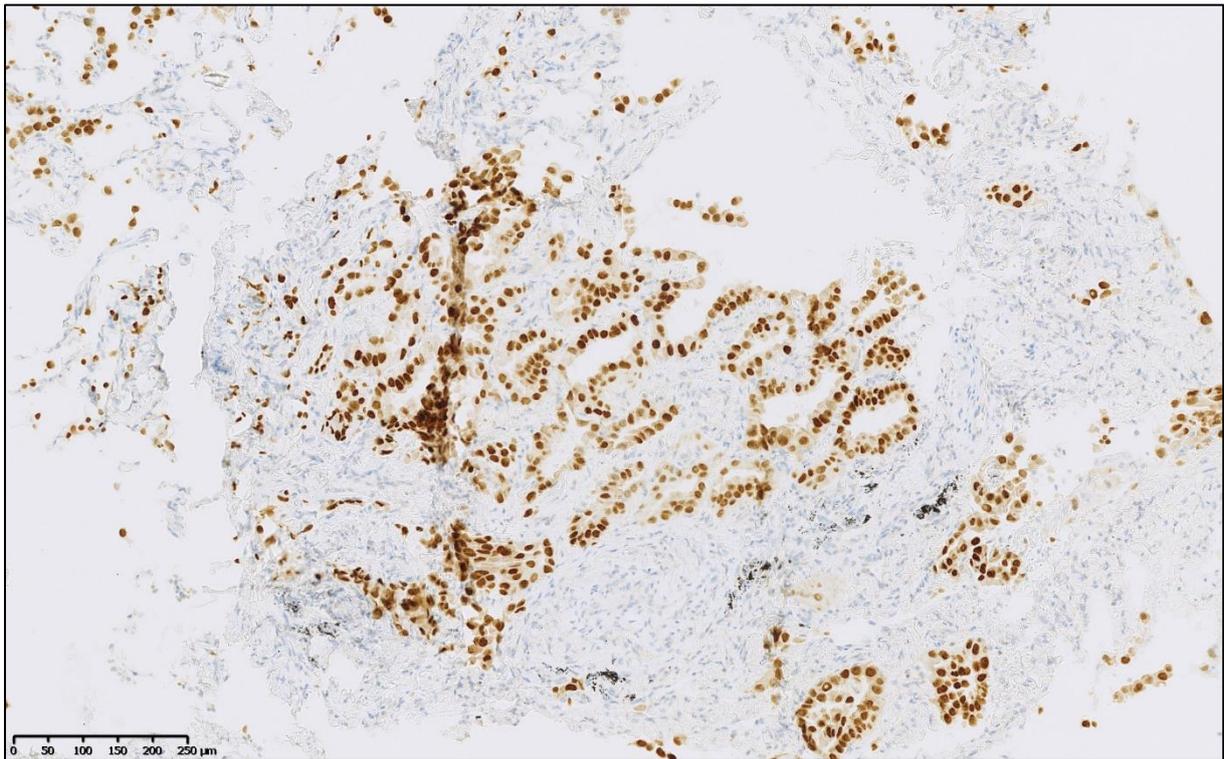


Figure 3 Immunohistochimie par anticorps anti-TTF1 dans un adénocarcinome pulmonaire, x 100 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

I.1.1.2. Carcinome épidermoïde

Il représente une proportion en diminution d'environ 20% des cas de cancer pulmonaire. Il s'agit d'une tumeur épithéliale maligne qui montre une kératinisation ou des ponts de jonction intercellulaires (Figure 4) ou exprime des marqueurs immunohistochimiques de différenciation malpighienne (P40, P63, CK5 ou CK5/6) sans expression de TTF1. Comme tous les cancers du poumon, il est associé avec le tabagisme mais de façon bien plus significative que l'adénocarcinome. En effet, la tendance mondiale de l'incidence du carcinome épidermoïde suit les variations de la consommation tabagique (2).

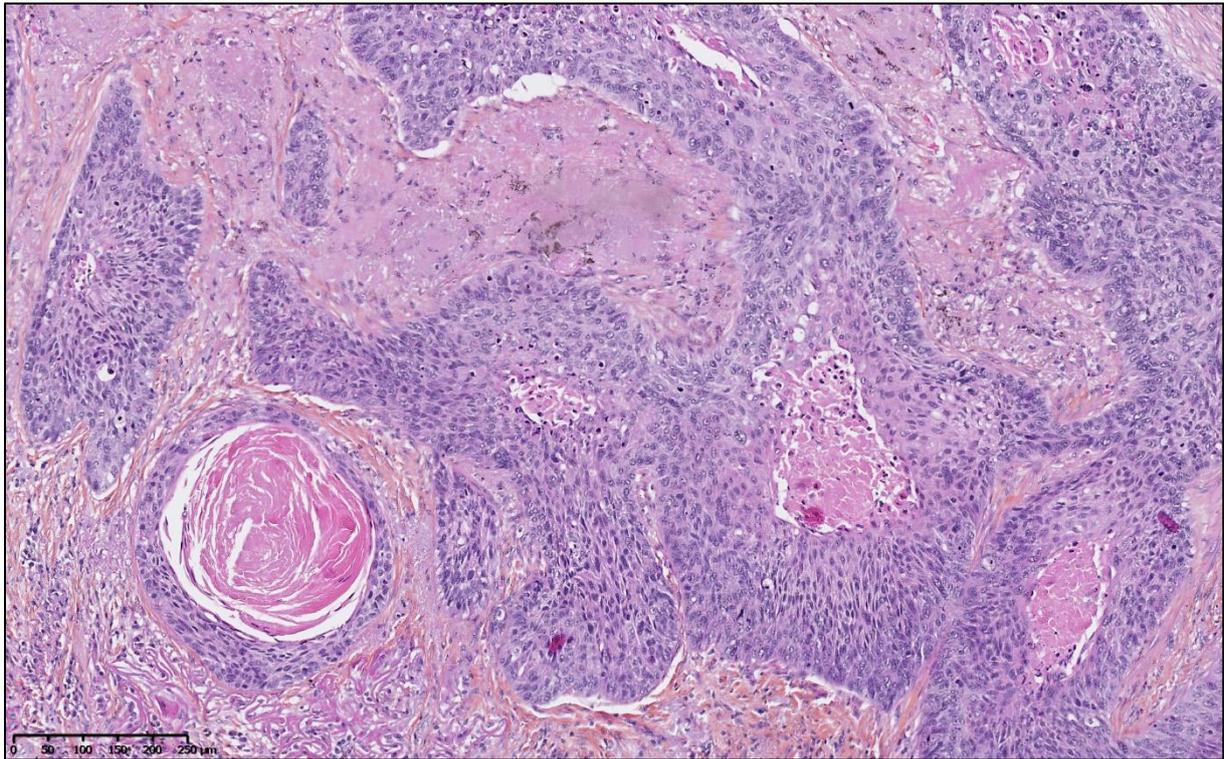


Figure 4 Carcinome épidermoïde, HES x 100 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

I.1.1.3. Carcinome à petites cellules

Le carcinome à petites cellules représente 13% des cas de cancer pulmonaire. Il correspond à une prolifération épithéliale maligne composée de petites cellules avec peu de cytoplasme, des limites mal définies. Les noyaux présentent une chromatine nucléaire fine granulaire avec un nucléole absent ou discret. Les cellules sont rondes, ovalaires ou fusiformes. Les artefacts d'écrasements nucléaires sont fréquents. La nécrose est typiquement extensive et l'index mitotique est élevé (Figure 5). La plupart des carcinomes à petites cellules exprime les marqueurs neuroendocrines en immunohistochimie (Chromogranine, Synaptophysine et NCAM) (Figure 6). Il montre une plus forte association avec le tabagisme que tous les autres principaux sous types de cancer pulmonaire (2).

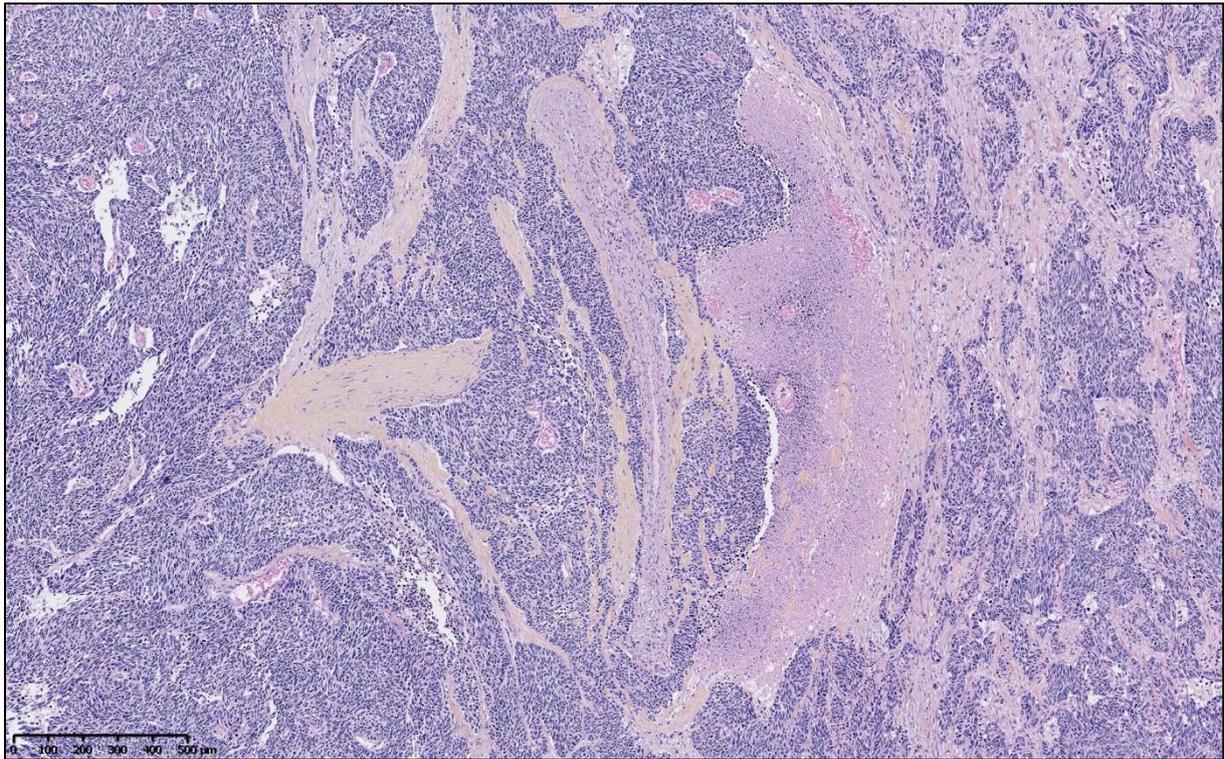


Figure 5 Carcinome à petites cellules, HES x 50 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

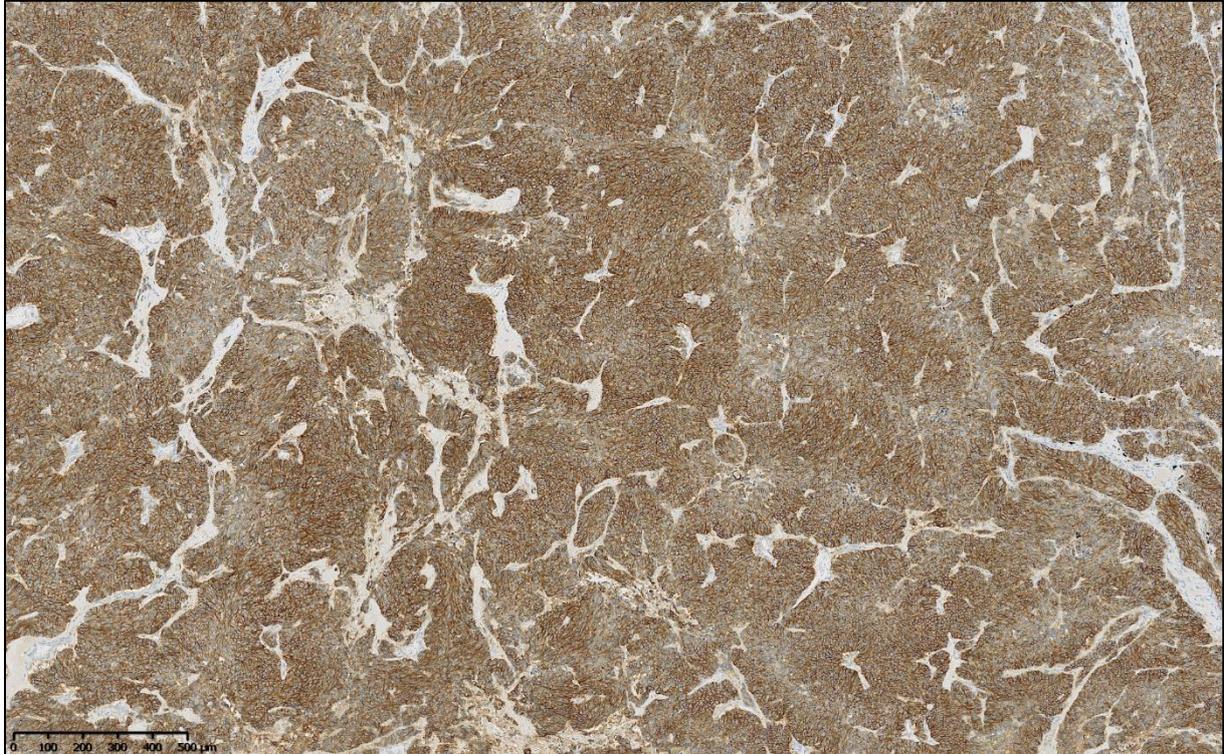


Figure 6 Immunohistochimie par anticorps anti-NCAM dans un carcinome à petites cellules, x 50 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

I.1.1.4. Carcinome à grandes cellules

Il représente 2% des cas de cancer pulmonaire. Il correspond à un carcinome non à petites cellules peu différencié qui ne possède pas les caractéristiques du carcinome à petites cellules, de l'adénocarcinome ou du carcinome épidermoïde (Figure 7). Ce diagnostic nécessite une résection complète et un échantillonnage minutieux de la tumeur.

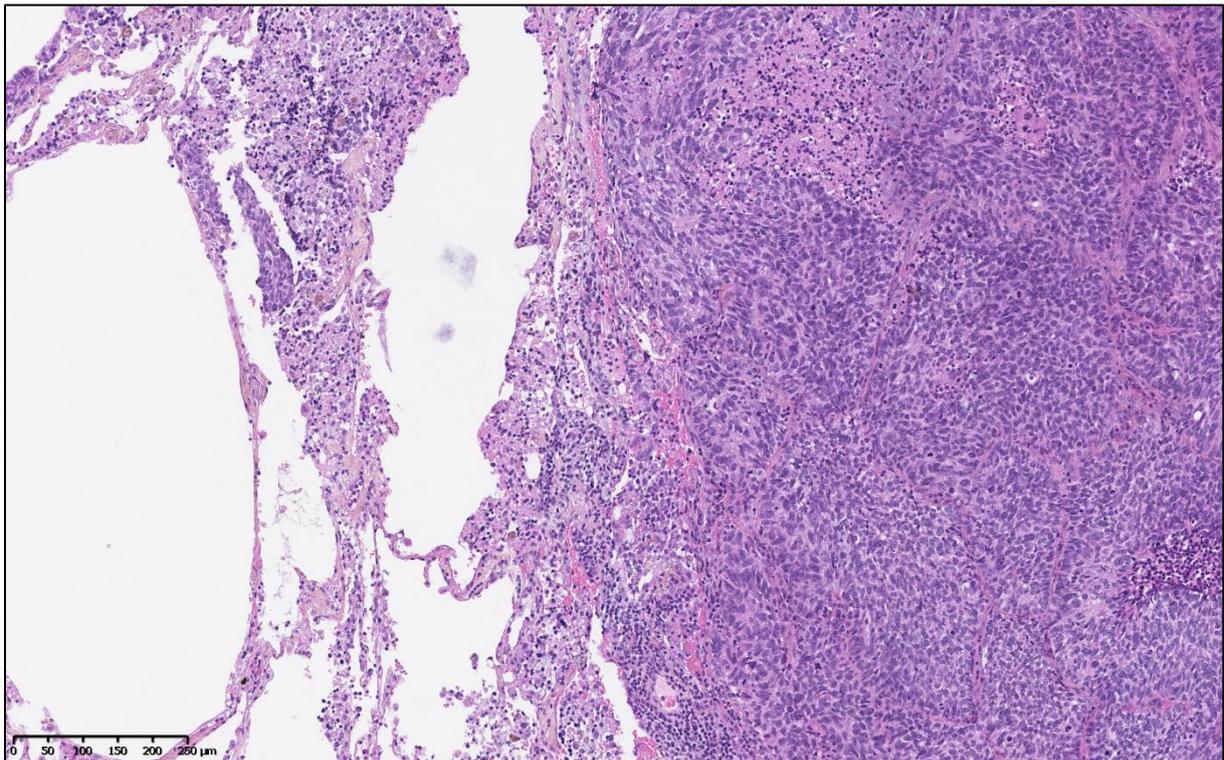


Figure 7 Carcinome à grandes cellules, x 100 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

I.1.1.5. Classification TNM

La 8^{ème} édition de la classification TNM (Tumor, Node, Metastasis) définit différents stades dans le cancer pulmonaire selon les trois items que sont l'extension de la tumeur primitive (T), l'absence ou la présence de ganglion régional métastatique (N) et l'absence ou la présence de métastase à distance (M) (Tableau 2) (3). Elle s'applique aux carcinomes pulmonaires incluant les carcinomes non à petites cellules, les carcinomes à petites cellules ainsi que les carcinoïdes bronchopulmonaires. Elle n'est pas utilisée pour les sarcomes et autres tumeurs pulmonaires rares.

		N0	N1	N2	N3
T1/M0	T1a	IA1	IIB	IIIA	IIIB
	T1b	IA2	IIB	IIIA	IIIB
	T1c	IA3	IIB	IIIA	IIIB
T2/M0	T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3/M0		IIB	IIIA	IIIB	IIIC
T4/M0		IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
TX/M1	M1a	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1b	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1c	IVB	IVB	IVB	IVB

Tableau 2 Stade de la 8^{ème} édition de la classification TNM du poumon (4).

Une majorité des cancers est diagnostiquée à un stade avancé. Les effectifs les plus nombreux se retrouvent parmi les stades IV, qui représentent 40% des cancers épidermoïdes et 60% des adénocarcinomes. La survie à 3 ans des épidermoïdes de stade IV est estimée à 2% et celle des adénocarcinomes à 7% (1).

I.1.2. Altérations moléculaires des cancers broncho-pulmonaires

Les cellules tumorales contiennent de nombreuses anomalies génétiques mais seules certaines de ces anomalies, les mutations « driver » sont essentielles à leur prolifération, survie et propagation. Les principales altérations permettent de définir le profil moléculaire et de prédire la réponse à une thérapie ciblée.

Les aberrations oncogéniques généralement ciblées dans le CBNPC, y compris les mutations de l'*EGFR*, les réarrangements *ROS-1* ou *ALK*, sont soit absentes, soit présentes à très basses fréquences dans les carcinomes épidermoïdes (5). Pour l'adénocarcinome, les altérations génétiques retrouvées sont présentées dans la Figure 8.

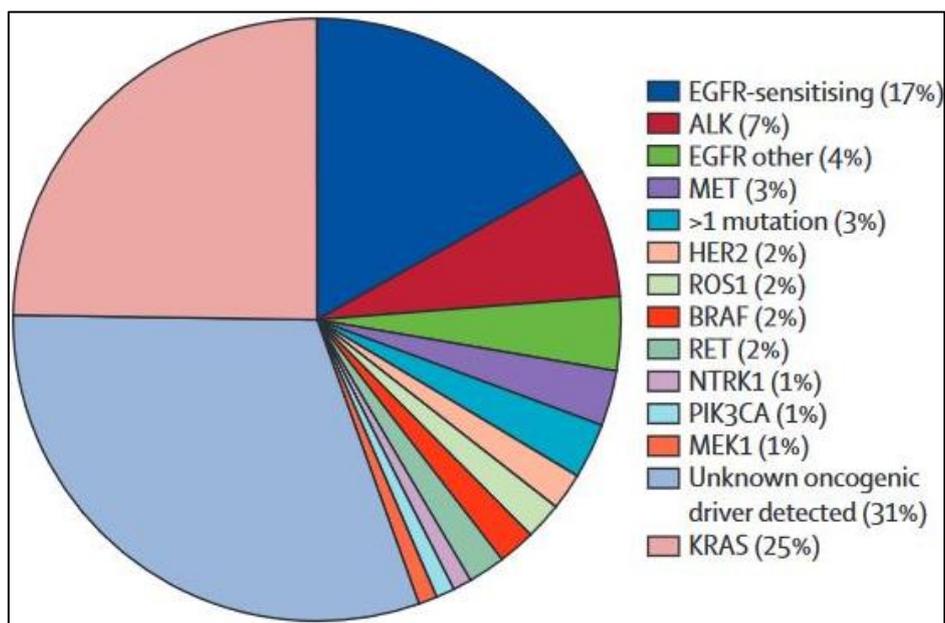


Figure 8 Fréquence des altérations génétiques dans les adénocarcinomes pulmonaires (6)

Pour les adénocarcinomes, la plupart des altérations des gènes codant pour des récepteurs tyrosine kinase, incluant les mutations du gène *EGFR* et les translocations des gènes *ALK*, *RET* et *ROS1*, sont retrouvées chez les patients non-fumeurs ou fumeurs occasionnels, tandis que d'autres altérations, comme les mutations de *KRAS* et *BRAF*, sont retrouvées plus souvent chez des patients fumeurs (7).

1.1.2.1. Gènes codant pour les récepteurs à activité tyrosine kinase

Les altérations géniques des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) codent pour des récepteurs à conformation et activité modifiées qui sont les principales cibles des thérapies ciblées actuelles. Les mutations d'*EGFR*, ou *HER2*, les mutations, et réarrangements par amplification ou translocation des gènes *ALK*, *MET* ou *ROS-1* conduisent en effet à l'expression de RTK à activité hautement oncogénique. La modification conformationnelle ou la surexpression qui en résulte entraîne leur activation permanente, indépendante de la fixation d'un ligand, avec pour effet une hyperactivation des principales voies de signalisation intracellulaires en aval, notamment la voie PIK3CA/AKT ou la voie des MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK) et des comportements cellulaires protumorigènes.

Les réarrangements activateurs du gène *ALK* (Anaplastic Lymphoma Kinase) par fusion avec le gène *EML4* ou d'autres partenaires sont observés dans 3 à 7 % des adénocarcinomes

pulmonaires (8). Ces réarrangements sont responsables d'une activité tyrosine kinase permanente via la dimérisation du domaine TK, indépendante de toute fixation à un ligand, et entraînant une nouvelle localisation et surexpression de la protéine dans le cytoplasme des cellules (9). Les réarrangements du gène *ALK* sont en général mutuellement exclusifs avec les mutations d'*EGFR* et de *KRAS* (10). Les patients présentant ces translocations répondent bien au crizotinib (ITK inhibiteur de ALK, MET et ROS1) et aux autres inhibiteurs de ALK (11). La recherche du statut ALK doit être systématique pour tout nouveau cas d'adénocarcinome bronchopulmonaire, CBPNC non épidermoïde, localement avancé ou métastatique. Le test utilisé en première intention est l'immunohistochimie (IHC). Un résultat IHC avec un marquage fort (score 3+) suffit à indiquer un traitement ciblé et ne requiert pas de contrôle FISH tandis qu'une absence de marquage en IHC (score 0) contre-indique l'utilisation d'une thérapie ciblée ALK. Les cas douteux en IHC, c'est à dire avec une intensité de marquage faible ou modérée (score 1+ ou 2+) doivent être contrôlés par technique FISH (12). Seul un résultat de FISH positif est dans ces cas-là une indication à un traitement par ALK.

L'activation des gènes *ROS1* et *RET* par fusion avec divers partenaires incluant *CD74* et *SLC34A2* est observée dans approximativement 1 % des adénocarcinomes pulmonaires (13). Elle confère une sensibilité au crizotinib comme pour les réarrangements d'*ALK*. La recherche du statut ROS1 est systématique pour tout nouveau cas d'adénocarcinome broncho-pulmonaire, CBPNC non épidermoïde, à un stade localement avancé ou métastatique. L'IHC est utilisée en 1ère intention. L'absence de marquage en IHC contre-indique l'utilisation d'une thérapie ciblée anti-ROS1. Tous les cas positifs en IHC, quels que soient l'intensité et le pourcentage de cellules marquées, sont à contrôler par FISH (14).

Les altérations de *MET*, en particulier de l'exon 14 sont détectées dans 3 à 4% des adénocarcinomes pulmonaires. Elles sont mutuellement exclusives avec les autres mutations drivers du cancer pulmonaire (15). La majorité des altérations au niveau de l'exon 14 est due à des anomalies d'épissage de l'ARN messager, engendrées par des mutations dans les sites introniques flanquant l'exon 14 et entraînant un saut d'exon. Cette anomalie d'épissage résulte en la production d'un récepteur cMET tronqué à qui il manque un site de liaison. La perte de ce site entraîne une diminution de l'ubiquitination et de la dégradation du récepteur à activité tyrosine kinase cMET, avec pour conséquence le maintien de son activation (16). Ces altérations sont associées à une sensibilité au capmatinib et au crizotinib avec une réponse partielle durable (15).

L'amplification de *MET* qui entraîne une surexpression du récepteur à activité tyrosine cMET a également été identifiée comme mécanisme de résistance aux thérapies par ITK-EGFR, car elle ré-active la voie PIK3CA/AKT. L'amplification de *MET* peut être due à une polysomie ou

une amplification spécifique du gène. Seule cette dernière, définie par un rapport cMET/centromère > à 5 en FISH (17), est associée à une réponse aux inhibiteurs de MET chez les patients (18). La prévalence de l'amplification de *MET* de novo est de 1 à 5 % en fonction des études et des seuils utilisés (19).

L'immunohistochimie permet de rechercher une surexpression protéique de cMET. Si elle est présente, l'amplification du gène *MET* est contrôlée par FISH. Les hauts niveaux d'amplification de *MET* en FISH sont associés avec une réponse importante sous crizotinib qui justifie son indication (17).

Les mutations somatiques d'*EGFR* (Epidermal growth factor receptor) sont observées dans 10 à 20% des cas d'adénocarcinome chez les patients de type caucasien (20). La fréquence atteint 44% pour des patients n'ayant jamais eu de consommation tabagique (21). La littérature reporte une relation étroite entre la positivité du TTF1 et la présence de mutation de l'*EGFR* (22). Ces altérations seront plus précisément abordées dans le chapitre I.2.

Les mutations ou amplification du gène *HER2/neu (ERBB2)*, codant pour le récepteur à activité tyrosine kinase HER2, membre de la famille d'EGFR, sont retrouvées dans 1 à 5 % des adénocarcinomes pulmonaires (23). La présence d'une altération d'*HER2* constitue une indication à un traitement par afatinib (Giotrif™) (24).

I.1.2.2. Gènes codant pour les protéines de la voie PIK3CA/AKT et MAPKinases

Les mutations de *KRAS* sont les altérations les plus fréquentes de la voie des MAP kinase (RAS-RAF-MEK-ERK) dans l'adénocarcinome pulmonaire avec une prévalence de 30 % dans la population caucasienne (25). Les mutations de *KRAS* et *EGFR* sont mutuellement exclusives. Les altérations de *KRAS* sont associées avec une absence de réponse aux thérapies ciblant l'EGFR (26) en particulier à l'erlotinib qui peut être prescrit en absence de mutation activatrice d'*EGFR*. Les inhibiteurs de MEK (trametinib et selumetinib) ont montré une efficacité mais plus en association à la chimiothérapie qu'en monothérapie (27) (28) sans donner lieu à de réelles indications.

Bien que la mutation du gène *KRAS* soit mutuellement exclusive avec les mutations d'*EGFR*, elle n'est pas toujours prédictive d'une absence de réponse chez les patients atteints de CBNPC traités avec des ITK d'EGFR (29). Certaines études ont ainsi démontré un avantage significatif en survie globale de l'erlotinib chez les patients atteints de tumeurs *EGFR* sauvage par rapport à d'autres approches thérapeutiques (30).

Les mutations du gène *BRAF* sont observées dans 2 à 10 % des adénocarcinomes pulmonaires (31), une proportion moins importante que dans les autres cancers tels que le mélanome ou le cancer colorectal (32). La mutation p.Val600Glu (V600E) est identifiée dans la moitié des cas d'adénocarcinome pulmonaire avec mutation *BRAF* (33). La plupart des mutations V600X du gène *BRAF* dans les cellules tumorales entraînent une augmentation de l'activité catalytique de la protéine correspondante qui est une kinase à activité sérine/thréonine et une hyperactivation en aval de la voie des MAP kinases (RAS-RAF-MEK-ERK). La mutation V600E confère une sensibilité et une indication à la bithérapie dabrafenib (inhibiteur de BRAF) / trametinib (inhibiteur de MEK1) (34).

Les mutations de *PIK3CA* sont observées dans 2% des cas d'adénocarcinome pulmonaire (21). Elles sont associées avec une réduction de la survie sans progression sous traitement par TKI et une diminution de la survie globale (35).

I.1.2.3. Inhibiteurs des checkpoints : marqueurs de réponse à l'immunothérapie PDL-1

Le système immunitaire est le mécanisme de défense naturel de l'organisme contre tout élément du non-soi. Les travaux et les connaissances des mécanismes de l'oncogenèse ont montré que le système immunitaire joue un rôle primordial dans la gestion des maladies cancéreuses, favorisant en théorie la destruction des cellules cancéreuses en tant qu'éléments du non-soi. Les principales cellules effectrices de cette action sont les lymphocytes T CD8+, également appelés lymphocytes cytotoxiques, qui détruisent des cellules tumorales. Le mécanisme de reconnaissance des cellules cibles est médié par un récepteur spécifique, le TCR (T Cell Receptor). Le TCR reconnaît des peptides antigéniques présentés par les cellules tumorales ou les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) à travers les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH, appelé également HLA chez l'humain). Les lymphocytes T CD8+ interagissent avec les CMH de classe I, et lorsque l'un d'eux reconnaît un peptide antigénique, il est activé et procède à la destruction de la cellule tumorale.

Il existe des récepteurs permettant de réguler cette activation à la surface du lymphocyte T. Le récepteur CTLA-4 régule négativement les lymphocytes T lorsqu'il interagit avec son ligand présenté par la cellule dendritique (CPA). Il en résulte une diminution de l'activation lymphocytaire par la cellule dendritique.

Le récepteur PD1 (Programmed Death 1) régule négativement les lymphocytes T lorsqu'il interagit avec le PDL1 (Programmed Death 1 Ligand) ou le PDL2 (Programmed Death 2

Ligand) présenté par les cellules tumorales. L'interaction entre PD1 et PDL1 ou PDL2 inhibe ainsi l'activation des lymphocytes (Figure 9) (36).

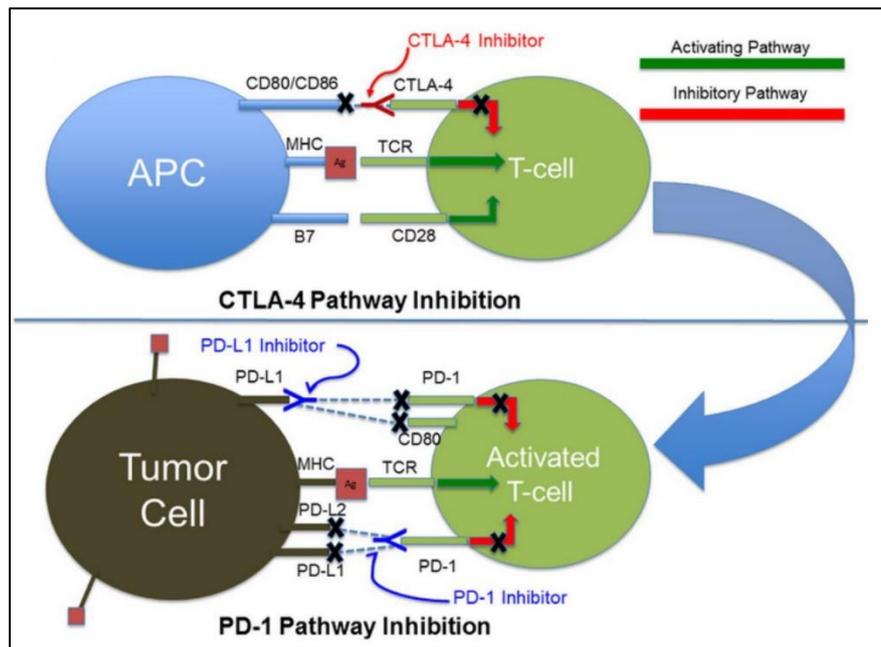


Figure 9 Représentation schématique des interactions du lymphocyte T dans le checkpoint immunitaire et effets des principaux anticorps monoclonaux (37)

Le CBNPC et le mélanome sont parmi les tumeurs solides qui présentent un fort caractère immunogénique expliqué par le nombre important de mutations qu'elle portent, donnant naissance à des variants protéiques appelés « néo-antigènes », c'est-à-dire des antigènes propres à une tumeur qui surviennent suite à une mutation (38). Malgré ce fort caractère immunogène et donc la haute probabilité que ces cellules tumorales soient reconnues comme éléments du non-soi, elles ne sont pas éliminées par le système immunitaire, conduisant à penser qu'elles mettent en place un système d'inhibition visant à endormir la cellule T, notamment par le système ligand récepteur PD-L1/PD-1.

L'expression de PD-L1 est recherchée par immunohistochimie. Elle est associée avec une augmentation de la survie sans récurrence et de la survie globale sous traitement par anti-PD1 en 1^{ère} ligne (39) et par anti-PDL1 en 2^{ème} ligne (40). Une expression supérieure ou égale au seuil de 50% sur les cellules tumorales, en l'absence d'altération d'*EGFR* ou d'*ALK*, est une indication à un traitement de 1^{ère} ligne par anti-PD1 (pembrolizumab) en monothérapie (41). La présence d'une expression supérieure ou égale à 1% confère aussi une sensibilité au pembrolizumab (42) qui reste pour l'heure une option thérapeutique de 2^{ème} ligne en dessous du seuil de 50%.

I.1.3. Traitement

Au niveau de la prise en charge thérapeutique, les cancers broncho-pulmonaires à petite cellule sont différenciés des autres entités histologiques et sont regroupés sous le nom de cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBNPC).

Le traitement des CBNPC fait intervenir différentes techniques de manière simultanée ou séquentielle en fonction du stade TNM (43).

Les traitements loco-régionaux sont la chirurgie et la radiothérapie.

La chirurgie est le traitement de référence. Les différents types d'opération sont la « wedge resection » (ou résection atypique), la segmentectomie, la lobectomie ou la pneumectomie selon la taille et la localisation de la lésion. Elle est envisageable jusqu'au stade IIIA, c'est-à-dire tant qu'il n'y a pas de métastase ganglionnaire controlatérale ou supraclaviculaire ou de métastase à distance.

La radiothérapie consiste à irradier la zone tumorale aux moyens de rayonnements ionisants. Ces derniers entraînent des lésions de l'ADN (cassure double brin ou modification de structure) directes et surtout indirectes, due aux réactions induites par les radicaux libres, qui sont responsables de l'action biologique essentielle des rayonnements. En effet, l'accumulation de ces altérations de l'ADN rend impossible la division cellulaire et entraîne une mort cellulaire différée lorsque la cellule entre en mitose (division du noyau des cellules). L'action des radiations ionisantes sur les cellules est ainsi d'autant plus forte que leur activité répliquative est intense comme c'est le cas pour les cellules tumorales. Elle est envisageable pour les stades I, II et III (44).

Les traitements systémiques sont la chimiothérapie, l'immunothérapie et les thérapies ciblées ou biothérapies.

Chimiothérapie : Les chimiothérapies anticancéreuses bloquent le cycle cellulaire et ciblent ainsi les cellules se divisant trop rapidement. Comme ces substances peuvent endommager les cellules, elles sont dites « cytotoxiques ». Certaines de ces molécules provoquent un véritable « suicide cellulaire » : l'apoptose.

La chimiothérapie est envisageable pour les stades II, III et IV. Les principales molécules utilisées dans le cancer pulmonaire sont les sels de platine (carboplatine, cisplatine), la vinorelbine, l'étoposide, la gemcitabine, le pemetrexed et les taxanes (docétaxel, paclitaxel) (45).

Immunothérapie : il s'agit d'un traitement qui vise à stimuler les défenses immunitaires de l'organisme contre les cellules cancéreuses. Les principales molécules utilisées servent à bloquer l'interaction PD-1/PD-L1. Il s'agit d'anticorps monoclonaux humanisés qui, se fixent sur le récepteur PD-1 (Anti PD-1 : pembrolizumab, nivolumab) ou sur le ligand PD-L1

(atezolizumab, durvalumab) et entrent donc en compétition avec leur partenaire respectif. Elle est envisageable uniquement pour les stades IIIB, IIIC et IV, en première intention pour le pembrolizumab et seulement en situation de rechute ou de récurrence pour les autres molécules (43).

Thérapies ciblées : Elles ont pour objectif de bloquer la croissance ou la propagation de la tumeur, en interférant avec des mécanismes particuliers, engendrés par des anomalies moléculaires stimulant les voies oncogéniques, et qui sont à l'origine du développement ou de la dissémination des cellules cancéreuses. Ces anomalies moléculaires somatiques, détectables dans la tumeur, sont donc la cible spécifique de ce type de thérapies, et leur présence/absence sert d'indication pour les prescrire. Les principales molécules sont des inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase (Tableau 3).

DCI	Nom commercial	Cible	Type d'altération
<i>afatinib</i>	Giotrif®	EGFR, HER2, HER4	Del ex19, L858R, L861Q, G719X, Amplification HER2
<i>gefitinib</i>	Iressa®	EGFR	Del ex19, L858R, L861Q, G719X
<i>gefitinib</i>	Gefitinib Mylan®	EGFR	Del ex19, L858R, L861Q, G719X
<i>erlotinib</i>	Tarceva®	EGFR	Del ex19, L858R, L861Q, G719X
<i>osimertinib</i>	Tagrisso®	EGFR	T790M, Del ex19, L858R, L861Q, G719X
<i>crizotinib</i>	Xalkori®	ALK, ROS, MET	Translocation, amplification
<i>alectinib</i>	Alecensa®	ALK	Translocation, amplification
<i>brigatinib</i>	Alunbrig®	ALK	Translocation, amplification
<i>ceritinib</i>	Zykadia®	ALK	Translocation, amplification
<i>nintedanib</i>	Vargatef®	PDGFR, FGFR, VEGFR	

Tableau 3 Inhibiteurs de tyrosine kinase autorisés par l'Agence Européenne de Médecine dans les CBNPC (46)

D'autres molécules inhibent la kinase à activité sérine/thréonine augmentée produite par la mutation du gène *BRAF* : Dabrafenib, en bi-thérapie avec le trametinib, inhibiteur de MEK se situant en aval dans la voie de signalisation des MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK). Ces thérapies ciblées sont envisageables en première et deuxième intention dans les cancers pulmonaires localement avancés ou métastatiques qui correspondent aux lésions non résécables par chirurgie de stades IIIB, IIIC et IV de la TNM 8^{ème} édition (43).

Enfin des thérapies ciblées sous forme d'anticorps monoclonaux sont également utilisées (Tableau 4).

DCI	Nom commercial	Cible	Type histologique de la tumeur
<i>bevacizumab</i>	Avastin®	VEGF	Autres que carcinome épidermoïde
<i>necitumumab</i>	Portrazza®	EGFR	Carcinome épidermoïde

Tableau 4 Anticorps monoclonaux autorisés par l'Agence Européenne de Médecine dans les CBNPC

Le traitement des cancers pulmonaires à petites cellules (CPC) consiste majoritairement en la chimiothérapie et la radiothérapie (TRT (thoracic radiation therapy), PCI (Prophylactic cranial irradiation)). La chirurgie n'a pas fait la preuve d'une efficacité en survie globale en combinaison à la chimiothérapie et la radiothérapie dans les stades localisés (47). En situation de récurrence des thérapies ciblées par anti-PD-L1 peuvent être envisagées (nivolumab avec ou sans ipilimumab) (48).

I.2. EGFR

I.2.1. Caractéristiques

Le gène *EGFR* code pour le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) un récepteur à activité tyrosine kinase chef de file de la famille des HER (Human Epidermal Growth Factor Receptor), comportant par ailleurs HER2, HER3 et HER4. Il comporte un domaine extracellulaire, une hélice transmembranaire, une région juxta-membranaire et un domaine kinase intra-cellulaire (49). La fixation d'un ligand comme l'EGF, le TGF α ou encore l'HB-EGF au niveau du domaine extracellulaire permet une homodimérisation ou une hétéro-dimérisation avec un autre récepteur de la famille des tyrosines kinases, ce qui entraîne une trans-phosphorylation du domaine kinase de chaque partenaire (49) et active les voies de signalisation intracellulaires en aval, notamment la voie PIK3CA/AKT ou la voie des MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK) pour les principales (Figure 10). Ces voies entraînent la modulation

d'un grand nombre de réponses cellulaires tumorales incluant la croissance, la prolifération, la dédifférenciation, la migration et l'inhibition de l'apoptose (50).

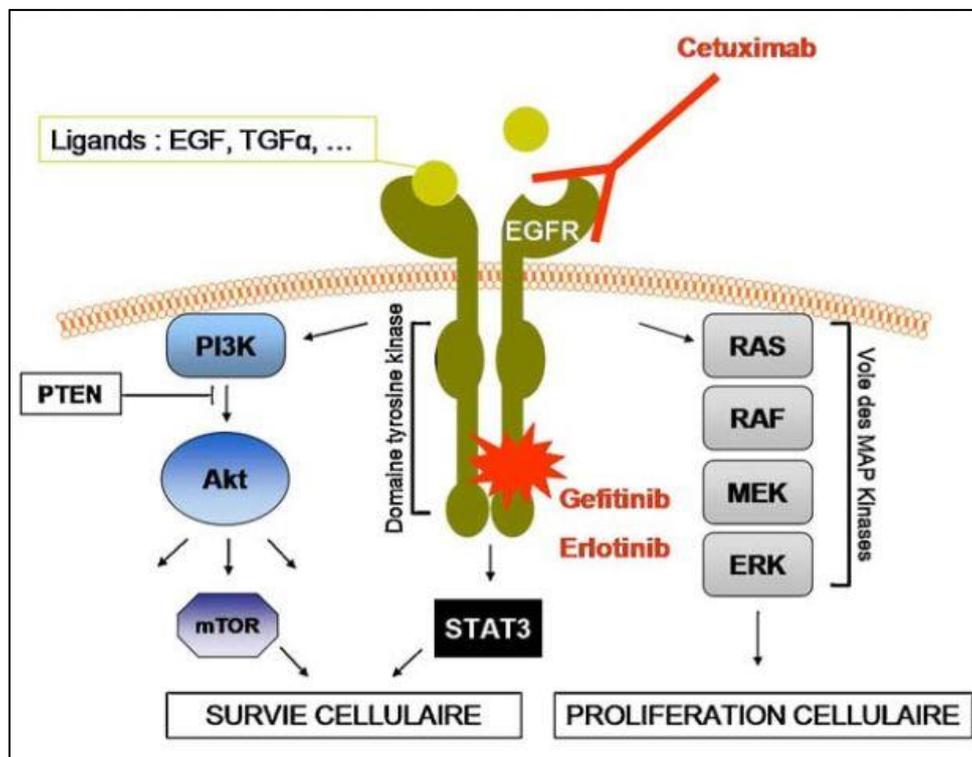


Figure 10 Représentation schématique du récepteur de l'Epidermal Growth Factor (EGFR) et des voies de signalisation sous-jacentes, ainsi que du mécanisme d'action de quelques molécules thérapeutiques capables d'inhiber ces mécanismes (cetuximab = anti-EGFR ; gefitinib et erlotinib = inhibiteurs de tyrosine kinase) (51)

I.2.2. EGFR : mutations activatrices et de résistances aux TKI de 1^{ère} et 2^{ème} génération

Ces mutations intéressent les exons 18 à 21, codant pour le domaine tyrosine kinase d'EGFR (Figure 11) (52) et entraînent une activation permanente de l'EGFR indépendante de toute fixation à un ligand.

La mutation la plus fréquente est une délétion de l'exon 19 (Del 19) qui représente 45% des mutations de l'*EGFR*. La mutation ponctuelle de l'exon 21 (p.Leu858Arg ou L858R) représente quant à elle 40% des mutations de l'*EGFR*. L'autre mutation activatrice de l'exon 21 est la mutation p.Leu861Gln (L861Q) avec une fréquence d'environ 2%.

D'autres mutations activatrices sont celles de l'exon 18 au niveau de la glycine 719 (p.Gly719Ala, p.Gly719Cys ou p.Gly719Ser) avec une fréquence d'environ 3% (53).

Elles confèrent une sensibilité aux thérapies ciblées par inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) première génération comme l'erlotinib (Tarceva®) et le gefitinib (Iressa®), ou deuxième

génération, actifs aussi sur les récepteurs de la famille HER incluant HER2 et HER4 (54), comme l'afatinib (Giotrif®) dans 70 à 80% des cas et sont indiqués dans le traitement des formes localement avancées ou métastatiques (55). Les ITK se logent dans la poche catalytique de l'EGFR en compétition avec l'adénosine triphosphate (ATP), empêchant la phosphorylation du récepteur et donc l'activation des voies de signalisation en aval (56).

Les traitements par anticorps monoclonaux chimérique (cetuximab), qui se fixent sur la portion extracellulaire du récepteur (Figure 10), n'ont pas fait la preuve d'une efficacité significative en terme de survie en combinaison avec la chimiothérapie dans les CBNPC (57). De plus ils sont associés à une majoration des effets indésirables chez des patients non sélectionnés (58).

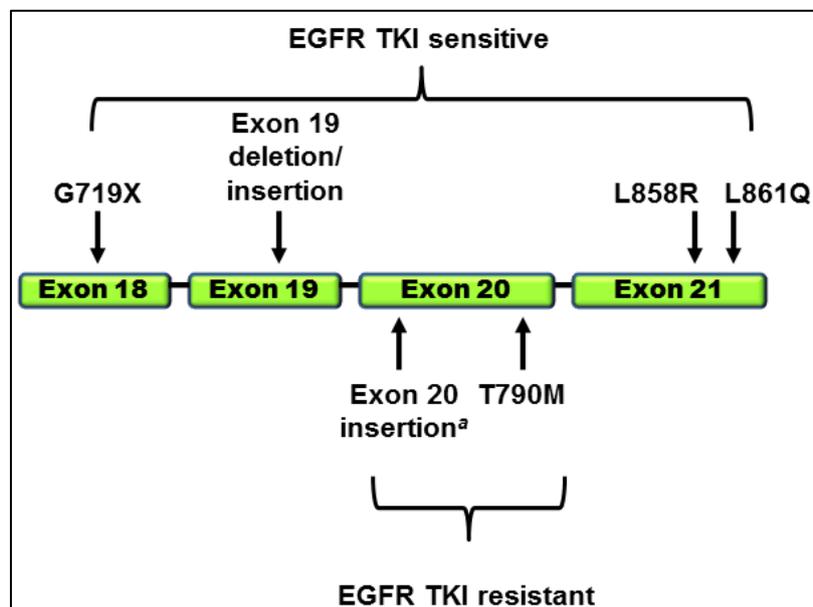


Figure 11 Représentation schématique des mutations principales d'*EGFR* constituant une indication de traitement par ITK (59)

Certaines mutations d'*EGFR* confèrent une résistance primaire aux TKI de 1^{ère} et 2^{ème} génération notamment les insertions au niveau de l'exon 20 de l'*EGFR* qui représentent 4 à 10% des mutations de l'*EGFR*. La plupart des insertions sont associées avec une diminution de la sensibilité aux TKI. Cependant la mutation A763_Y764insFQEA est une exception dans les études rétrospectives avec une augmentation de la sensibilité aux TKI (53).

Chez les patients présentant une mutation activatrice d'*EGFR*, une résistance secondaire aux TKI de 1^{ère} et 2^{ème} génération finit toujours pas apparaître dans un délai moyen de 10 mois après l'initiation du traitement (60).

Cette résistance est associée dans environ 50 % des cas à la présence d'une mutation de l'exon 20 d'*EGFR* (p.Thr790Met ou T790M) (61) (62).

I.2.3. EGFR : mutations activatrices et de résistances aux TKI 3^{ème} génération

Pour contrecarrer la résistance induite par la mutation T790M aux ITK 1^{ère} et 2^{ème} génération, des ITK de troisième génération (osimertinib, rociletinib) sont maintenant disponibles, capables de cibler les récepteurs EGFR engendrés par les doubles mutations activatrice/T790M. Ces ITK 3^{ème} génération sont indiqués en traitement de seconde intention des formes métastatiques (55) avec un taux de réponse de 60% (63). L'osimertinib vient par ailleurs d'obtenir l'AMM en 1^{ère} ligne dans les CBNPC localement avancés ou métastatiques avec mutation activatrice et quel que soit le statut mutationnel T790M de l'*EGFR* (64).

Sous TKI de 3^{ème} génération, il existe une progression systémique des CBNPC après une médiane de 9,6 mois (65).

L'apparition de la mutation p.Cys797Ser (C797S) au niveau de l'exon 20 d'*EGFR* est le plus fréquent des mécanismes secondaires de résistance à l'osimertinib dans les CBNPC (66). La région codée par C797 est localisée à l'opposé de celle de T790 dans la poche de liaison à l'ATP et forme une liaison covalente avec tous les ITK de 2^{ème} et 3^{ème} génération, s'opposant ainsi à leur inhibition de l'activité d'*EGFR* (67) (68). Les données *in vitro* montrent que lorsque cette mutation apparaît en *Cis*, c'est-à-dire sur le même allèle que la mutation T790M, le récepteur *EGFR* obtenu sera résistant à tous les ITK (1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} génération) et représente pour l'instant une impasse thérapeutique. A l'inverse lorsqu'elle est en *Trans*, c'est-à-dire sur des allèles différents, certains allèles vont coder pour un récepteur *EGFR* avec une modification T790M (résistant aux ITK 1^{ère} et 2^{ème} génération) et d'autres pour un récepteur *EGFR* avec une modification C797 (résistant aux ITK 2^{ème} et 3^{ème} génération). Cette conformation rend possible l'utilisation de l'association d'un ITK de 1^{ère} et de 3^{ème} génération en bithérapie pour prolonger le traitement par ITK (69).

De nouvelles mutations de résistance à l'osimertinib sont par ailleurs régulièrement découvertes comme les mutations d'*EGFR* au niveau des codons Leu718 ou Leu792 (70).

I.2.4. Autres mécanismes de résistance aux ITK

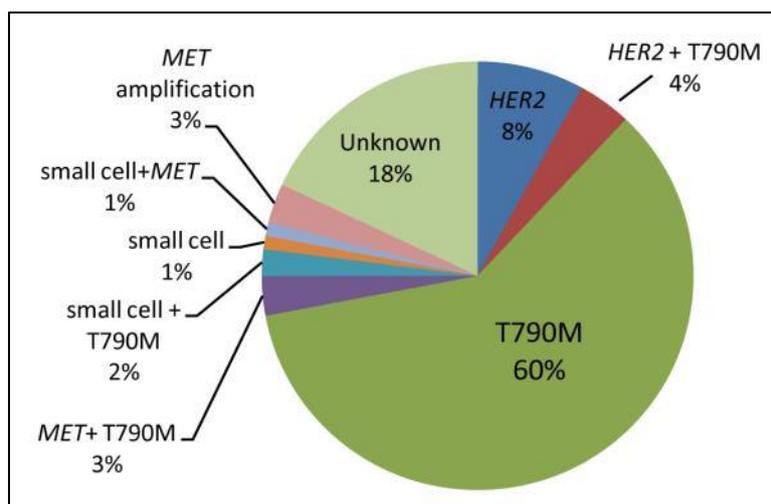


Figure 12 Fréquence relative des différents mécanismes de résistance acquise aux ITK (71).

Ces mécanismes (Figure 12) découlent de l'hétérogénéité tumorale. Une tumeur se compose de différentes populations tumorales présentant des aspects histologiques et des altérations moléculaires différentes. La pression de sélection induite par le traitement, fait émerger une population tumorale résistante à la thérapie en cours. Il peut s'agir soit de cellules tumorales sélectionnées ne présentant pas les mutations d'*EGFR*, de cellules présentant des mutations activant d'autres voies d'oncogenèse ou plus rarement de cellules de type histologique différent.

Ainsi la perte de la mutation de T790M initialement présente est parfois observée dans les résistances à l'osimertinib. Elle suggère bien une hétérogénéité génomique sous-estimée associée à une résistance aux ITK de l'*EGFR* dans le CBNPC (72).

I.2.4.1. Facteurs de résistance réactivant les voies de signalisation

L'amplification d'*HER2* a été identifiée comme un mécanisme de résistance aux ITK de 1^{ère} génération (71) mais aussi à l'osimertinib (73). L'amplification d'*HER2* est présente chez 1% des adénocarcinomes pulmonaires avant traitement mais pour près de 13% des adénocarcinomes pulmonaires devenus résistants aux inhibiteurs du récepteur à l'EGF (71). L'amplification *HER2* est en général mutuellement exclusive de la mutation T790M d'*EGFR* (74). L'afatinib, ITK de 2^{ème} génération actif sur *HER2*, a montré une efficacité dans les CBNPC avec amplification *HER2* (75).

L'apparition d'une amplification de *MET* de novo et la surexpression de la protéine cMET est un des mécanismes de résistance qui apparaît dans environ 5% des cas après traitement par ITK-*EGFR* (71). Dans les cas de récurrence, la surexpression de *MET* en IHC et l'amplification

du gène *MET* en FISH, sont une indication pour un traitement par crizotinib en plus de la thérapie par ITK, avec des réponses cependant assez hétérogènes (76).

Les mutations de *KRAS* et *PIK3CA* ont été évoquées comme mécanisme de résistance potentiel.

Bien que les mutations d'*EGFR* et *KRAS* soient quasi mutuellement exclusives, elles peuvent être présentes simultanément sous la pression sélective du traitement par ITK de l'*EGFR* (77). Les patients avec mutation d'*EGFR* traité par ITK qui développent une mutation de *KRAS* ont une survie globale diminuée par rapport aux patients de type sauvage pour ce gène, suggérant un rôle des mutations de *KRAS* dans la résistance acquise aux ITK d'*EGFR* (78).

Bien qu'intervenant en aval dans la voie de signalisation de l'*EGFR*, les mutations de *PIK3CA* ne sont pas significativement associées à une résistance primaire aux ITK de l'*EGFR* chez les patients atteints d'adénocarcinome du poumon. De plus les mutations *PIK3CA* acquises suite au traitement par ITK sont rares (79).

I.2.4.2. Changement de phénotype histologique et transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

Le dernier mécanisme de résistance connu est la transformation histologique de la tumeur. La transformation en carcinome à petites cellules représente environ 3% des cas de résistance (71). Cette transformation peut être la transformation d'un adénocarcinome en carcinome à petites cellules ou carcinome épidermoïde avec préservation des mutations *EGFR* initialement présentes (80) (81). Des transformations en carcinome à petites cellules avec apparition concomitante d'une mutation de résistance T790M ont aussi été décrites (82). Enfin la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (83) qui correspond à une dédifférenciation des cellules tumorales qui perdent leur morphologie différenciée, épithéliale et deviennent fusiformes (84), peu différenciées, est aussi un mécanisme de résistance. Ce changement de phénotypique cellulaire s'associe à des changements moléculaires qui pourraient servir de marqueurs pour la résistance.

I.3. Biopsies liquides

I.3.1.1. Intérêt, principes et natures des biopsies liquides

Le tissu tumoral est habituellement utilisé pour identifier les mutations activatrices ou de résistance d'*EGFR*. L'analyse d'échantillons de tissus est considérée comme le « gold standard » car elle fournit des informations combinées sur l'histologie de la tumeur et ses

altérations génomiques. Néanmoins, l'utilisation de tissu et en particulier de biopsies présente également plusieurs inconvénients. Tout d'abord elles ne concernent qu'un échantillon de la tumeur entière et ne sont donc pas nécessairement représentatives de son hétérogénéité génomique globale. De plus, en situation métastatique, les altérations moléculaires des lésions à distance peuvent être différentes de celles de la tumeur primitive et une biopsie dans la localisation la plus accessible ne sera pas représentative de l'ensemble des caractéristiques moléculaires tumorales inter-sites. En outre, les biopsies thoraciques montrent des taux élevés de complications cliniques et peuvent être techniquement difficiles, voire impossibles ou cliniquement non réalisables du fait de l'état du patient (85) (86).

Des avancées technologiques récentes ont mis en avant les avantages d'un autre type de prélèvement : Les biopsies liquides.

Les biopsies liquides peuvent être obtenues par des prélèvements sanguins peu invasifs et sont donc accessibles dans presque toutes les situations cliniques. Elles peuvent également être réalisées à partir de différents liquides de l'organisme. Même si le sang est le plus utilisé, elles peuvent intéresser le liquide céphalo-rachidien (87) (88), les urines (89) (90) ou la salive (91) (92) (93).

Les biopsies liquides sont principalement de trois types en fonction du matériel analysé (Figure 13).

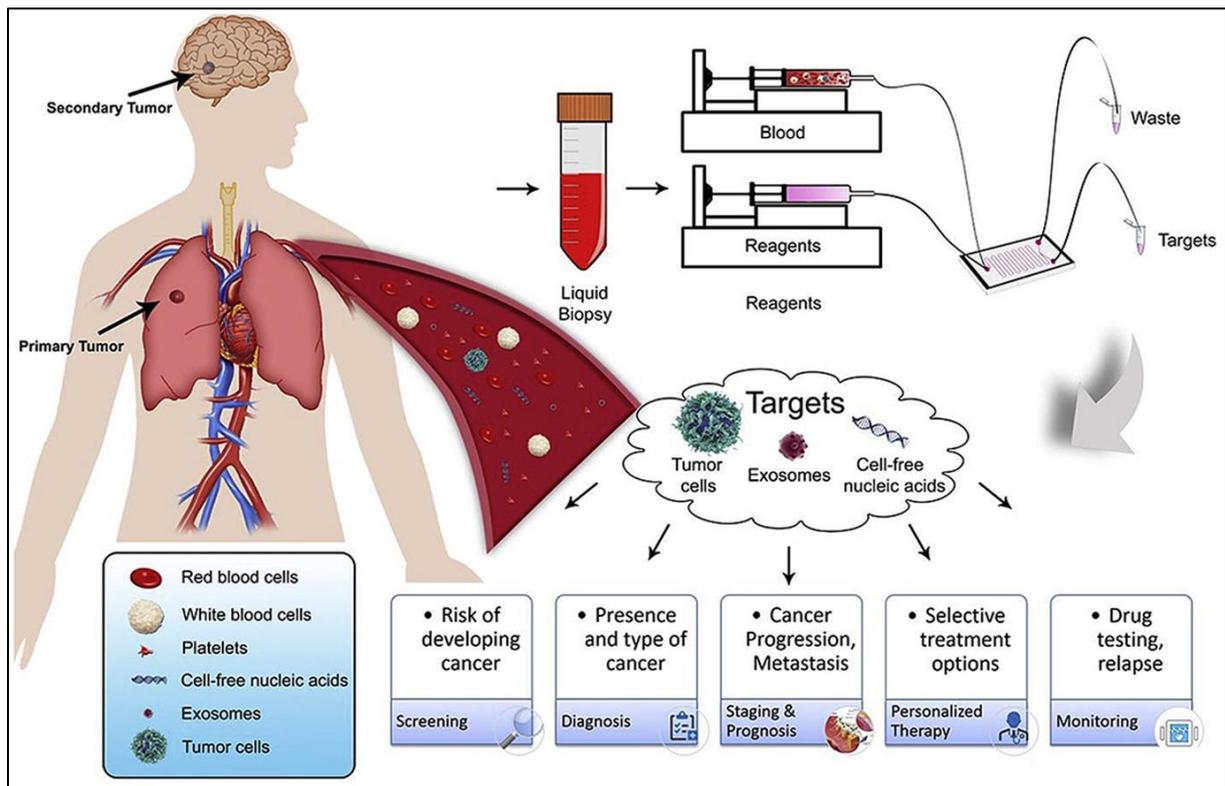


Figure 13 Différentes cibles des biopsies liquides et leur utilisation pour les différentes phases de la prise en charge clinique (94)

Les analyses peuvent porter sur les cellules tumorales circulantes (CTCs). Ces cellules ont la capacité de quitter le site tumoral primitif, de circuler et de survivre dans le système vasculaire. Elles sont à l'origine de la dissémination métastatique (95). Dans une étude incluant 846 patients avec 15 types de cancer différents, leur recherche a permis de détecter la présence d'une tumeur métastatique dans 80% des cas (96). Leur mise en évidence nécessite des techniques d'enrichissement et d'identification complexes et n'a pour l'instant pas donné lieu à des applications en pratique diagnostique courante.

Les analyses peuvent être réalisées sur les exosomes, des vésicules de 40 à 120 nm formées à partir des endosomes tardifs contenant des protéines, de l'ADN et de l'ARN sécrétées dans le milieu extracellulaire par les cellules. Ces vésicules sont internalisées par divers mécanismes dans d'autres cellules et servent ainsi de médiateur de communication (92). Le message transporté peut réguler l'expression de cellules cibles et induire un changement phénotypique spécifique (97). Ces mécanismes de communication sont utilisés par les exosomes tumoraux pour moduler le microenvironnement, l'invasion et la migration des cellules tumorales, ou même favoriser la formation de foyers pré-métastatiques (98) (99).

Récemment, il a également été découvert que les cellules cancéreuses résistantes à la chimiothérapie peuvent transmettre cette résistance à d'autres cellules cancéreuses via les exosomes (100).

Il est possible d'isoler sur les exosomes des protéines ancrées dans la membrane spécifiques d'un type tumoral (tel que le Glypican-1 dans l'adénocarcinome canalaire du pancréas) (101). De plus il a été démontré qu'on retrouve de l'ADN double brin issu de la cellule parentale dans les exosomes (102). Ces deux données ouvrent la possibilité d'isoler les exosomes libérés par une tumeur spécifique, via des biomarqueurs de surface exosomaux, et d'obtenir ainsi l'ADN ou les protéines propres à cette tumeur pour pouvoir les caractériser.

Enfin les analyses peuvent être réalisées sur les acides nucléiques circulants parmi lesquels on retrouve l'ADN tumoral circulant et les micro-ARN (miARN).

Les miRNA font partie des acides nucléiques circulants mais ils sont aussi retrouvés dans les cellules tumorales circulantes et les exosomes. Les miARN sont des molécules d'ARN non codantes qui régulent l'expression des gènes (103). Un seul miARN peut influencer l'expression de plusieurs gènes dans le corps humain. De plus, alors que les miARN sont répartis dans l'ensemble du génome humain, la plupart des miARN se trouvent dans des sites fragiles qui sont rapidement supprimés dans différents types de cancer (103) (104). Par conséquent, les altérations des miARN sont capables de refléter la progression et le développement du cancer. Les marqueurs les plus courants qui montrent des altérations du miARN chez les patients atteints de cancer colorectal, du poumon, du sein et de la peau sont miR-21, miR-320a, miR-423-5p et miR-24 (105). Cependant aucune technique d'analyse des miARN n'a donné de résultats prometteurs en tant que technique diagnostique de routine sur les biopsies liquides.

Enfin les analyses peuvent être réalisées sur l'ADN tumoral circulant qui apparaît comme la source la plus stable et la plus facilement accessible d'information génomique tumorale (106) (107).

I.3.2. Cas particulier de l'ADN tumoral circulant

La découverte de l'ADN tumoral circulant date de 1977 (108) avec une mise en évidence de la première mutation sur le gène *NRAS* en 1994 (109), qui a donné naissance au concept de « biopsie liquide ».

L'ADN tumoral circulant (ADNtc) est l'ADN tumoral retrouvé dans le sang circulant. Il est émis dans la circulation suite à la nécrose et l'apoptose des cellules tumorales mais aussi probablement par sécrétion active (Figure 14) (110). Ce dernier processus concerne également l'ensemble des cellules non tumorales de l'organisme en particulier les cellules hématopoïétiques (111). Ainsi circulent dans le sang des fragments d'ADN représentatifs de l'ensemble du génome cellulaire d'un organisme (112). L'ADNtc représente souvent seulement une faible fraction (< 1%) de l'ensemble de l'ADN circulant hors des cellules (cfDNA) (113).

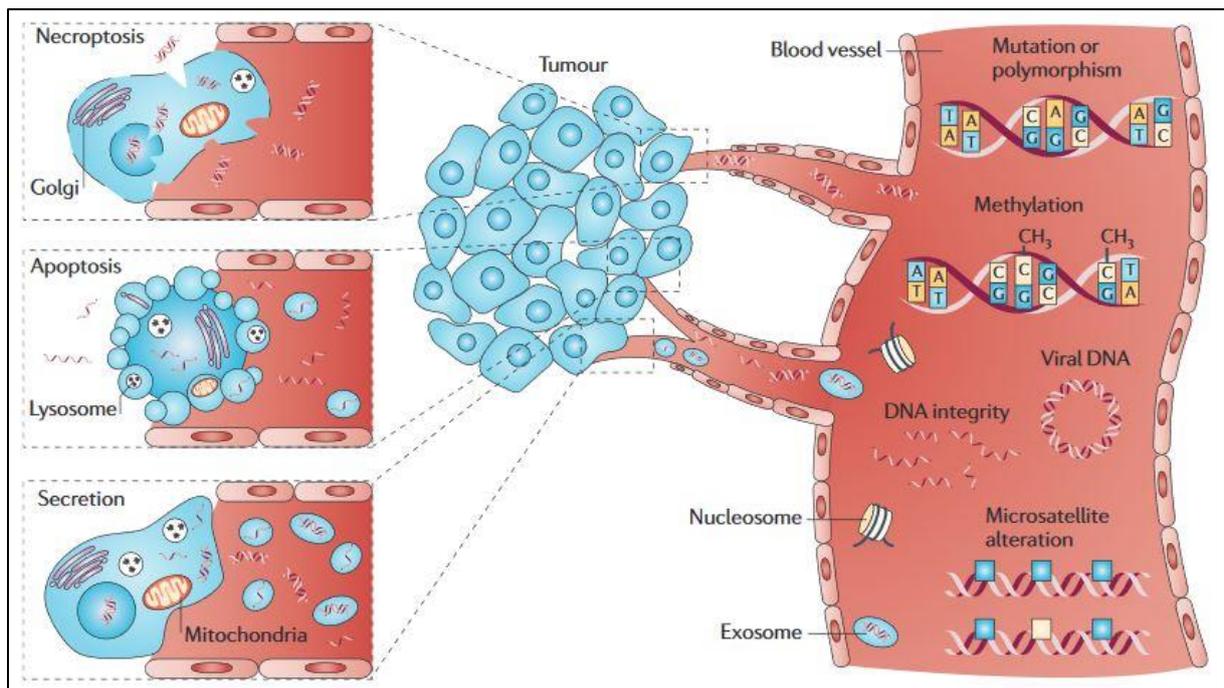


Figure 14 Origine des acides nucléiques circulants et types d'altérations retrouvées (114).

L'analyse de l'ADNtc permet la caractérisation des mutations somatiques au diagnostic et de manière dynamique tout au long du traitement, avec une détection précoce de l'apparition des mutations de résistance. Elle représente aussi un moyen de suivre la réponse au traitement et de détecter une maladie résiduelle (Figure 15) (85) (113).

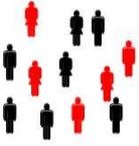
		Marqueurs sériques	ADN circulant
 DEPISTAGE		Aucune application Défaut de spécificité	En cours d'évaluation
	 DIAGNOSTIC	Apport limité	Utilisation validée En l'absence de biopsie solide
SUIVI 	BILAN INITIAL	Pronostic	Utilisation validée
	MALADIE RESIDUELLE	Utilisation	Apport potentiel
	RESISTANCES	Utilisation	Utilisation validée

Figure 15 Comparaison des applications des marqueurs sériques tumoraux (côlon : ACE, sein : CA15.3, prostate : PSA, ovaire : CA125, testicule : hCG, thyroïde : Tg) et de l'ADN tumoral circulant (115).

La recherche de mutations somatiques directement sur l'ADNtc, s'est donc imposée comme l'outil diagnostique le plus adapté pour la détection de la mutation de résistance T790M du gène *EGFR* chez les patients atteints de CBNPC traité par inhibiteur de tyrosine kinase (116). Par ailleurs, cet outil est en train d'être décliné pour être utilisé dans toutes les recherches de mutations utiles à la prise en charge que ce soit pour l'*EGFR*, les autres mutations des CBNPC ou des autres pathologies cancéreuses.

La recherche de mutations sur l'ADNtc a mis plus de 30 ans à se mettre en place depuis sa découverte en 1977. En effet, au vu de la faible quantité de matériel circulant, elle requiert une méthodologie précise et adaptée aussi bien au niveau de la phase pré-analytique que pendant la phase analytique.

I.3.2.1. Phase pré-analytique

La phase pré-analytique doit faire l'objet d'une gestion rigoureuse du prélèvement sanguin. Les génotypages sont réalisés de préférence à partir de plasma et non de sérum (117). En effet, le sérum est obtenu après centrifugation du sang collecté sur tube sec (sans anticoagulant). Sa composition diffère du plasma car il a subi les modifications liées à la coagulation qui aboutissent à une lyse cellulaire en particulier des leucocytes (117). Les leucocytes étant des cellules nucléées comportant de l'ADN physiologique, leur lyse entraîne

le relargage de l'ADN génomique présent dans leur noyau. Ces grandes concentrations d'ADN génomique qui ne comporte pas les mutations somatiques présentes dans la tumeur, vont diluer l'ADNtc. Elles peuvent donc masquer une éventuelle mutation somatique qui devient indétectable car en dessous du seuil de sensibilité de la plupart des techniques de génotypage (118)(119). Il a été montré que la concentration d'ADN est 3 à 24 fois supérieure dans le sérum par rapport au plasma (120).

Afin de travailler sur du plasma, dans lequel les leucocytes sont intacts, les tubes EDTA classiquement utilisés pour la récupération du sang doivent être centrifugés dans les 3 heures après prélèvement pour éviter toute lyse cellulaire/coagulation. Sur tubes EDTA cette lyse devient totale au-delà des huit premières heures et entraîne une importante libération d'ADNg (121). Ce prérequis peut être problématique lorsque les prélèvements sont réalisés à distance d'une plateforme de biologie moléculaire. Différents fabricants ont proposé au cours des dernières années des tubes adaptés permettant d'allonger le délai de prise en charge. Les tubes « Cell-Free DNA Collection Tube » proposés par la société Roche (122) ou encore les tubes Cell-Free DNA BCT proposés par la société Streck (119) contiennent ainsi des réactifs capables de maintenir l'intégrité des leucocytes et de prévenir leur lyse de manière prolongée.

I.3.2.2. Phase analytique

En raison de la faible quantité d'ADN circulant contenant une proportion encore plus faible d'ADNtc avec un nombre variable d'allèles mutés, il est nécessaire de disposer de méthodes sensibles et spécifiques, capables de détecter un petit nombre de molécules mutées dans une grande quantité de fragments d'ADN non mutés (123) (124).

Bien qu'il existe de très nombreuses méthodes de génotypage, la plupart ne sont donc assez sensibles pour détecter des mutations de faible fréquence allélique ou nombre de copies. Dans les CBNPC localement avancés ou métastatiques, la sensibilité varie de 74 à 100 % pour la détection de la mutation L858R et de 29 à 71 % pour la mutation T790M en fonction de la méthode de détection utilisée (125).

Technique	Sensitivity	Optimal Application
Sanger sequencing	> 10%	Tumor tissue
Pyrosequencing	10%	Tumor tissue
Next-generation sequencing	2%	Tumor tissue
Quantitative PCR	1%	Tumor tissue
ARMS	0.10%	Tumor tissue
BEAMing, PAP, Digital PCR, TAM-Seq	0.01% or lower	ctDNA, rare variants in tumor tissue

Figure 16 Comparaison du pourcentage d'allèle muté nécessaire pour avoir une sensibilité et une spécificité suffisante des techniques de détection (113).

Comme présenté dans la Figure 16, quelques unes des méthodes de génotypage possibles, des moins sensibles aux plus sensibles sont :

Séquencage Sanger et Pyroséquencage

Les approches de séquençage standard telles que le séquençage de Sanger ou le pyroséquencage ne permettent de détecter des fragments mutés dérivés d'une tumeur que chez des patients présentant une charge tumorale importante avec des taux élevés d'ADNtc (113).

PCR spécifique d'allèle, ARMS et PCR digitale

Les techniques les plus utilisées en routine visent à identifier les mutations les plus fréquentes ou hot spots dans le cadre des CBNPC : PCR spécifique d'allèle (PCR en temps réel ou quantitative PCR) (126), ARMS (127), PCR digitale (dPCR) (128) (129) (130). Les principes de ces techniques sont décrits dans les paragraphes matériels et méthodes correspondants. La polymérisation activée par pyrophosphorolyse (PAP) est une forme de PCR spécifique d'allèle améliorée utilisant un oligonucléotide activable par pyrophosphorolyse (P*) uniquement lorsqu'il est apparié fidèlement à son brin complémentaire de la matrice allélique à l'extrémité 3' (131).

Le BEAMing qui tire son nom de ses quatre composants principaux (billes, émulsion, amplification et magnétisme) est une technique de PCR digitale particulière où la molécule d'ADN est liée à une bille magnétique pour pouvoir être récupéré au moyen d'un aimant après PCR en microémulsion (132) (133) (134).

Séquençage nouvelle génération (NGS)

Les techniques précédentes visent à détecter une seule ou un petit nombre d'altérations simultanément. Avec le nombre toujours croissant de marqueurs à rechercher pour la prise en charge des patients la tendance est à l'analyse de panels de gènes plus larges, voire d'exome ou de génome, notamment pour la recherche de réarrangements par des approches basées sur le séquençage nouvelle génération à grande profondeur (Deep Next Generation Sequencing, dNGS).

Le séquençage massivement parallèle représente une forme particulièrement puissante de technique de génotypage puisque des centaines de millions de molécules cibles peuvent être analysées séparément et simultanément. Cependant, le séquençage massivement parallèle ne peut généralement pas être utilisé pour détecter des variants rares en raison du taux d'erreur élevé associé au processus de séquençage (135).

La recherche de mutations rares ne nécessite pas le génotypage de l'ensemble du génome, la librairie peut donc être enrichie en sélectionnant uniquement les fragments d'ADN d'intérêt. Ces techniques d'enrichissement permettent ainsi de simplifier les analyses bioinformatiques (Base calling) et d'augmenter la sensibilité.

Les deux méthodes d'enrichissement sont la capture et l'amplification réalisée par PCR.

➤ **Tam-Seq™** (Invivata™)

La méthode par amplification ou par amplicon permet d'amplifier uniquement les régions d'intérêt avec plusieurs couples d'amorces (multiplex). Le séquençage d'amplicons marqués (TAm-Seq) a été la première technique de séquençage de ce type adaptée à la détection de rares mutations dans l'ADN circulant. Il s'agit d'un processus d'amplification en deux étapes avec une préamplification dans laquelle l'ensemble des amorces sont utilisés pour capturer les molécules d'intérêt présentes dans l'échantillon puis d'une seconde étape d'amplification avec un nombre limité de couple d'amorces dans les micro-chambres d'une matrice. La technologie TAM-Seq, spécifique pour les biopsies liquides permettait initialement l'analyse de 6 gènes sur une vaste région génomique couvrant 5995 bases (107). Actuellement, de nombreux panels ciblés de NGS sont développés et utilisés en routine diagnostique comme le panel Ion AmpliSeq™ Colon and Lung Cancer Research Panel v2 qui couvre 22 gènes (136).

➤ **CAPP-Seq**

Cet enrichissement peut aussi se faire par capture en filtrant les fragments d'ADN d'intérêt qui s'hybrident à des séquences complémentaires biotinylées disposées sur une plaque ou en milieu liquide.

Récemment, une méthode de détection basée sur la capture CAPP-Seq (Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing), utilisant des «sélectionneurs» biotinylés a été développée. Dans le cancer du poumon, elle pourrait identifier des mutations chez 95% des patients atteints de CPNPC avec une spécificité de 96% pour des fractions d'allèles mutés allant jusqu'à environ 0,02% (137). Cependant, le CAPP-Seq reste coûteux pour les laboratoires de routine, avec un coût estimé à 200–300 USD (138).

UMI, UID

Pour surmonter les inconvénients du NGS dûs aux erreurs de la PCR (par exemple erreurs d'ADN polymérase, génération de doublons de PCR résultant du séquençage de la même molécule plusieurs fois, etc.), l'ajout d'identifiants moléculaires uniques (UMI, UID), qui sont des séquences de nucléotides aléatoires uniques marquant distinctivement chaque fragment d'ADN de l'échantillon initial, a été introduit avant l'étape d'amplification par PCR (139). Le panel Oncomine Lung cfDNA Assay inclut ce type de marqueurs moléculaires (140) et couvre 11 gènes (141). Il sera décrit plus en détail dans la partie matériels et méthodes.

II. Objectif

En raison de la faible quantité de matériel, la recherche de mutations sur l'ADNtc nécessite des conditions pré-analytiques contrôlées standardisées et des techniques analytiques très sensibles.

D'après les expériences et les retours de l'ensemble des plateformes de génétique moléculaires (PGMC) du territoire français, nous avons constaté que la fréquence de la mutation T790M dans les CBNPC récidivant sous ITK était d'environ 15% pour la PGMC de Limoges, soit largement inférieure à la fréquence d'environ 50% reportée dans la littérature (61) (62) et à la fréquence de détection reportée par des PGMC utilisant diverses autres techniques pour la même analyse et la même catégorie de patients.

Compte-tenu de ces éléments, nous avons construit un projet autour de l'amélioration et de la standardisation de la phase pré-analytique puis de la comparaison de plusieurs techniques de génotypage.

L'objectif principal de ce travail était donc de comparer la sensibilité et la spécificité des méthodes de prélèvement et d'analyse pour la recherche de la mutation T790M d'*EGFR* dans l'ADNtc chez les patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire localement avancé ayant progressé sous traitement ITK.

Brièvement, les conditions de la phase préanalytique ont été précisées en comparant les performances des tubes de prélèvements EDTA et Roche. Ensuite, différentes techniques d'analyse ont été mises au point et comparées en termes de sensibilité, et de spécificité au moyen de standards de références commerciaux.

Enfin la méthode la plus sensible a été utilisée pour rechercher de manière rétrospective la mutation de résistance T790M pour des patients ayant récidivé sous ITK et pour lesquels la mutation n'avait pas été détectée par la technique de routine. Les nouvelles analyses ont été réalisées en premier lieu sur le plasma prélevé à récurrence, puis dans un second temps dans le tissu de la tumeur primitive, afin de savoir si la mutation T790M était déjà présente mais non détectée au diagnostic.

III. Matériels et méthodes

III.1. Comparaison des performances des tubes de prélèvements EDTA et Roche

III.1.1. Prélèvements des échantillons sanguins

Les manipulations ont été réalisées à 5 reprises pour valider la méthode.

Un volontaire sain, ne présentant à priori pas de mutation *EGFR* a été choisi pour le prélèvement de 10 tubes de sang réalisé au centre de prélèvement du CHU de Limoges : 5 sur tubes EDTA (BD Vacutainer® blood collection tubes) classiquement utilisés et 5 sur tubes Roche® (Cell-Free DNA Collection Tube). Ces tubes contiennent un conservateur cellulaire qui empêche la lyse des cellules sanguines nucléées (122). La quantité de sang prélevé était en moyenne de 6 mL pour les tubes EDTA et de 7mL pour les tubes Roche®. Le volume des tubes a été équilibré au moyen d'une pipette électronique pour que chaque tube contienne un volume de 6 mL de sang.

III.1.2. Obtention et ajout de l'allèle *EGFR* muté

Nous avons réalisé des solutions calibrées de fragments *EGFR* mutés dans l'objectif de mimer les mutations présentes dans l'ADNtc des patients.

III.1.2.1. Obtention d'amplicons *EGFR* comportant les mutations L858R et T790M à partir de la lignée cellulaire NCI-H1975

1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADNg a été obtenu à partir de la lignée cellulaire NCI-H1975 (ATCC, Rockville, USA) provenant d'un adénocarcinome pulmonaire et comportant les mutations L858R et T790M d'*EGFR*.

L'extraction d'ADN a été réalisée selon le protocole recommandé par le fournisseur, Promega® Maxwell 16 FFPE Plus DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA), à partir d'un culot sec de $5 \cdot 10^6$ cellules. Brièvement, après lyse cellulaire et élimination des protéines par une protéinase K sous incubation avec agitation à 70°C pendant 20 heures, les échantillons d'ADN ont été déposés sur des cartouches Maxwell® 16 LEV DNA en face de tubes d'élution de 70 µl pour extraction automatisée sur l'extracteur Maxwell 16 MDx.

L'ADNg contenu dans le tampon d'élution a été quantifié par un dosage fluorimétrique (Quantus Fluorometer, Promega) en utilisant le kit Quantifluor dsDNA System (Promega, Madison, USA) selon le protocole du fournisseur. : 1 µl de chaque produit d'extraction ou 1 µl

de TE 10X pour le blanc et 1 µl de Quantifluor ONE Lambda DNA pour le tube standard (calibration) ont été mélangés avec 199 µl de Quantifluor ONE dsDNA. Les tubes ont été ensuite agités puis centrifugés avant d'être placés à l'obscurité pendant 5 minutes à température ambiante. Après passage du blanc et du tube standard, la concentration en ADN des échantillons a été évaluée sur le fluorimètre.

2. Amplification par PCR et séquençage de l'ADN

➤ Amplification par PCR

Le design des amorces encadrant les mutations L858R et T790M des exons 21 et exon 20 d'*EGFR* a été réalisé avec le logiciel Primer 3 en ligne (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) selon le design indiqué dans le Tableau 5. Les amorces ont été choisies suffisamment à distance de la mutation, afin d'être certains que l'amplicon contienne la séquence cible des amorces des différentes techniques analytiques (COBAS, pyroséquençage, NGS, ...).

Amorce	Tm (°C)	Séquence (5'-3')	Taille de l'amplicon (pb)
EGFRex21s	60	AGCCATAGGTCCTCGACGTG	440
EGFRex21as	60	AGGAGACCCTGGCTGGAC	
EGFRex20s	60	CCTCCCTCCAGGAAGCCTAC	233
EGFRex20as	60	TTATCTCCCCTCCCCGTATC	

Tableau 5 Design des amorces PCR pour l'amplification des séquences contenant les mutations L858R et T790M des exons 21 et 20 d'*EGFR* respectivement.

La PCR a été réalisée avec le système enzymatique AmpliTaq Gold® 360 : 20ng d'ADNg a été mélangé avec l'AmpliTaq Gold® 360 Buffer 1X, MgCl₂ 2mM, 6 µL de 360 GC Enhancer, un mélange de dNTP 200 µM chacun, 1,25 unités d'AmpliTaq Gold® 360 DNA Polymerase, 0,4µM de chaque amorce dans un volume final de 50µL.

L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur Veriti 96 Well (Applied Biosystem®) selon le programme suivant :

- 95°C - 10 minutes
 - 95°C - 30 secondes
 - 60°C - 30 secondes
 - 72°C - 60 secondes
 - 72°C - 7 minutes
 - 15°C - ∞
- } 40 cycles

➤ Purification des produits PCR

5 µL de produits PCR ont été mélangés avec 2 µL d'Illustra ExoProstar 1 (GE Healthcare, Little Chalfont, Royaume-Uni) et le mélange a été incubé dans un thermocycleur pendant 15 min à 37°C puis 15 min à 80°C

3. Séquençage des fragments amplifiés

➤ Réaction de séquençage par la méthode de Sanger

Le séquençage a été réalisé en mélangeant 1 µL d'ADN purifié avec 2 µL de Big Dye, 2 µL de tampon Big Dye, 4,8 µL d'H₂O et 10 µM de chaque amorce pour un volume final de 10 µL. Puis la réaction de séquençage a été réalisée sur thermocycleur Veriti 96 Well (Applied Biosystem, Foster City, USA) avec le programme suivant :

- 96°C - 1 minute
 - 96°C - 10 secondes
 - 56°C - 5 secondes
 - 60°C - 4 minutes
 - 10°C - ∞
- } 35 cycles

➤ Purification des produits de séquençage

Cette étape a été réalisée avec le kit DyeEx® 2.0 Spin Kit selon le protocole du fournisseur par dépôt sur une colonne et centrifugation.

➤ Résultats du séquençage

Le séquençage de l'ADNg des cellules NCI-H1975 a permis d'identifier les mutations d'intérêt c.2573T>G, p.Leu858Arg et c.2369C>T, p.Thr790Met (Figure 17).

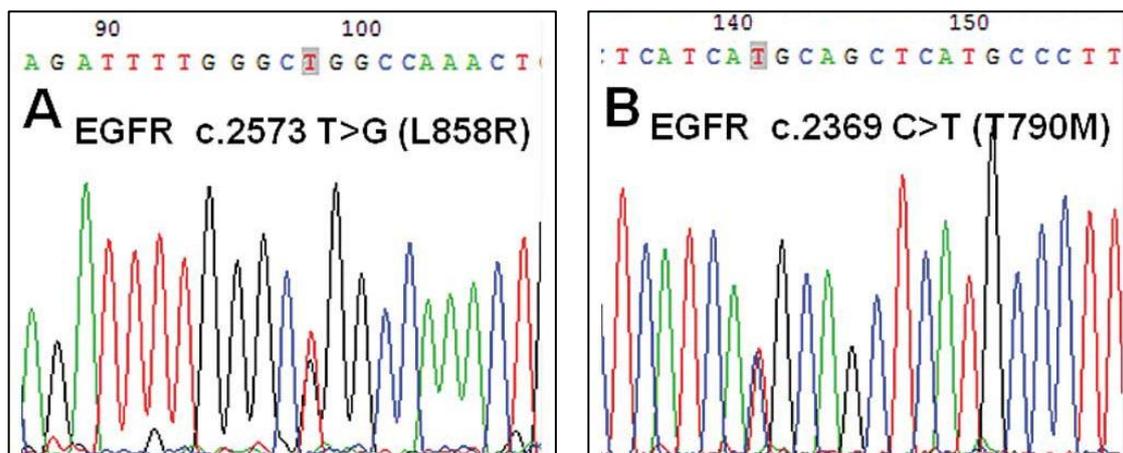


Figure 17 Séquence des fragments d'EGFR contenant les mutations L858R et T790M

4. Quantification, calcul du nombre de copies et dilution des produits PCR *EGFR* mutés exon 21 L858R et exon 20 T790M

➤ Quantification au Qubit

Le dosage au Qubit (ThermoFisher Scientific, Eugene, USA) des produits PCR après l'étape de purification a permis d'évaluer la concentration de l'amplicon L858R à $1,04 \cdot 10^4$ ng/mL et celle de l'amplicon T790M à $6,5 \cdot 10^3$ ng/mL.

➤ Calcul du nombre de copies *EGFR* exon 21 L858R et *EGFR* exon 20 T790M présents dans le produit PCR (Tableau 6).

	Fragment L858R	Fragment T790M
Taille du fragment (pb)	440	230
Masse molaire du fragment ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$) <i>1pb = 660 g.mol⁻¹</i>	$2,9 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$
Concentration (ng/mL)	$1,04 \cdot 10^4$	$6,5 \cdot 10^3$
Concentration ($\text{g} / \mu\text{L}$)	$1,04 \cdot 10^{-8}$	$6,5 \cdot 10^{-9}$
Concentration ($\text{mol} / \mu\text{L}$) <i>1 mole contient $6,02 \cdot 10^{23}$ molécules ou copies</i>	$3,6 \cdot 10^{-14}$	$4,2 \cdot 10^{-14}$
Nombre de copies/ μL	$2,2 \cdot 10^{10}$	$2,5 \cdot 10^{10}$
Pourcentage d'allèle muté	72 %	80%
Nombre de copies d'allèle muté/ μL	$1,5 \cdot 10^{10}$	$2 \cdot 10^{10}$
Nom de la solution mère	B0	D0

Tableau 6. Calcul du nombre de copies *EGFR* mutés exon 21 L858R et exon 20 T790M dans le produit PCR.

➤ Dilutions successives à partir des solutions mères B0 et D0 (Tableau 7).

La concentration est donnée en nombre de copies d'allèle muté par μL de solution

Fragment L858R		Fragment T790M	
Nom	Concentration	Nom	Concentration
B0	$1,5 \cdot 10^{10}$	D0	$2 \cdot 10^{10}$
B1	$1,5 \cdot 10^8$	D1	$2 \cdot 10^8$
B2	$1 \cdot 10^6$	D2	$1 \cdot 10^6$
B3	$1 \cdot 10^5$	D3	$1 \cdot 10^5$
B4	$1 \cdot 10^4$	D4	$1 \cdot 10^4$
B5	$1 \cdot 10^3$	D5	$1 \cdot 10^3$
B6	$1 \cdot 10^2$	D6	$1 \cdot 10^2$

Tableau 7 Dilutions des fragments *EGFR* mutés L858R et T790M

III.1.2.2. Constitution des échantillons artificiels par ajout de l'allèle muté dans les prélèvements sanguins

La robustesse et la longévité de conservation des tubes EDTA et ROCHE a été comparée en évaluant par pyroséquençage la variation de fréquence de la mutation L858R de l'exon 21 d'*EGFR*, c'est-à-dire sa disparition ou sa stabilité au cours du temps.

1. Calcul du nombre de copies *EGFR* apporté au cours d'une réaction de Pyroséquençage classique

La quantité d'ADN muté à ajouter a été déterminée pour être dans les limites de sensibilité de la technique de PCR pyroséquençage en PyromarkQ24 (Qiagen, Courtabœuf, France). En effet cette technique permet de déterminer le pourcentage d'allèle muté de l'ADN analysé et ainsi de pouvoir suivre sa variation consécutive à l'éventuel relargage d'ADN génomique par l'éclatement des cellules leucocytaires.

La masse d'ADN apportée lors du protocole de pyroséquençage classiquement réalisé au laboratoire sur les ADN de tissus FFPE est de 10 ng d'ADN génomique total. En considérant qu'au sein d'un génome diploïde de $3,4 \cdot 10^9$ pb, le fragment *EGFR* exon 21 ciblé par les amorces de PCR-pyroséquençage a une longueur de 100pb, alors sa masse est de $2,9 \cdot 10^{-16}$ g correspondant à 2650 copies par réaction (Tableau 8).

	Génome humain entier (diploïde)	Fragment <i>EGFR</i>
Longueur en pb	$3,4 \cdot 10^9$	100
Masse molaire (g.mol ⁻¹)	$2,244 \cdot 10^{12}$	$6,6 \cdot 10^4$
Masse apportée en PCR pyro (g)	$10 \cdot 10^{-9}$	$2,9 \cdot 10^{-16}$
Moles apportée en PCR pyro (nombre)	$4,4 \cdot 10^{-21}$	$4,4 \cdot 10^{-21}$
Nombre de copies/réaction de pyroséquençage	$2,65 \cdot 10^3$	$2,65 \cdot 10^3$

Tableau 8 Calcul du nombre de copies *EGFR* apportées au cours d'un pyroséquençage

2. Calcul du nombre de copie à apporter dans le sang

Afin de pouvoir être dans les limites de sensibilité du pyroséquençage, le plasma utilisé pour l'analyse devait donc contenir 2650 copies d'*EGFR* avec mutation L858R, soit pour une extraction réalisée à partir de 2 mL de plasma après centrifugation, une concentration de 1325 copies/ml de plasma.

En considérant que la centrifugation de 6 ml de sang nous permet de récupérer environ 3 ml de plasma, il nous faut donc, selon une règle de proportionnalité, apporter 3975 copies de fragment *EGFR* exon 21 muté L858R dans nos échantillons sanguins pour obtenir la concentration attendue.

Pour ce faire, 3,9 µl de la solution B5 à $1 \cdot 10^3$ copies/µl (Tableau 7) ont été rajoutés dans les 4 tubes EDTA (tubes (2) à (5)) et les 4 tubes Roche (tubes (7) à (10)). Les tubes (1) et (6) sont les témoins négatifs dans lesquels aucun fragment muté *EGFR* L858R n'a été ajouté (Figure 18).

3. Stockage

Les tubes ont ensuite été conservés à température ambiante entre 18° et 25° conformément à la notice d'utilisation des tubes Cell-Free DNA Collection Tube (Roche) qui rapporte une stabilité des échantillons sanguins prélevés pendant 7 jours à ces températures (122) .

III.1.3. Récupération du plasma

Les tubes ont été pris en charge avec des délais de plus en plus longs allant du jour même (J0) à 10 jours (J10) pour évaluer l'effet de la durée du stockage sur l'analyse de la mutation selon le type de tube (Figure 18).

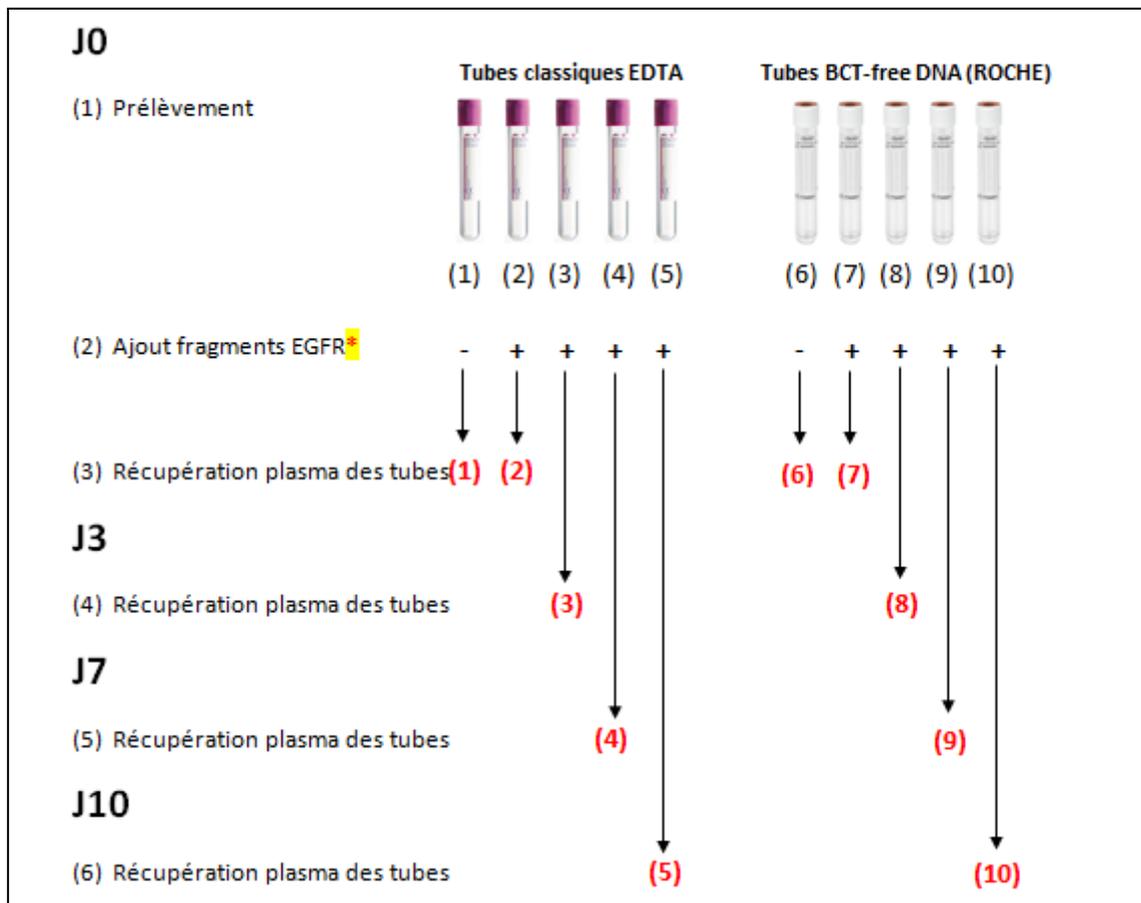


Figure 18 Protocole de comparaison des performances de conservation des tubes EDTA et Roche

Le protocole de récupération du plasma était similaire à un protocole déjà validé (142). Les tubes ont été centrifugés à 2000 rcf pendant 10 min à température ambiante à deux reprises avec récupération du plasma dans un tube à centrifuger de 50 ml. Après homogénéisation à l'aide d'un agitateur de type vortex à faible vitesse, des aliquots de plasma de 1,1 ml ont été réalisés dans des cryotubes préalablement annotés (soit 2 cryotubes par échantillon de sang). Ces tubes ont ensuite été conservés au congélateur à -80°C.

III.1.4. Génétique moléculaire

1. Extraction de l'ADNtc à partir du plasma

Le plasma a été extrait en duplicata (2 x 1 ml) avec le Kit Promega Maxwell RSC ccfDNA Plasma Kit (Promega, Madison, USA) selon le protocole du fournisseur (143).

L'extraction a été réalisée par l'ajout de 1 ml de plasma sur une cartouche Maxwell en face d'un tube d'élution de 60 µl puis extraction automatique d'ADNtc sur l'automate Maxwell 16 MDx.

Après transfert des contenus des tubes d'élutions correspondant au même échantillon initial dans un même tube de 1,5ml à vis, l'ADN est quantifié au Quantus Fluorometer.

Après évaporation complète des tubes au bain marie à sec à 56 °C (ou 37°C en cas d'évaporation sur la nuit), le culot est repris dans 5 µl d'eau nucléase-free.

2. PCR Pyroséquencage

Le Pyroséquencage est précédé d'une PCR qui s'effectue avec des amorces encadrant la cible, dont l'une est marquée par une biotine. Après la PCR, la liaison de l'amplicon contenant la biotine sur des billes de streptavidine permet de le purifier, le dénaturer puis le séquencer par ajout successif de l'un des 4 dNTP. Lorsque le système choisi d'injecter un dNTP particulier, si ce dernier est incorporé par l'ADN polymérase en 3'OH du brin en élévation, car complémentaire de la matrice, un pyrophosphate est relargué suite à la création de la liaison phosphodiester et converti en ATP par une ATP sulfurylase. L'ATP permet la conversion de la luciférine en oxyluciférine médiée par une luciférase. La chimioluminescence produite lors de cette réaction de catalyse est détectée par des capteurs CCD et apparaît sous la forme d'un pic au niveau des données brutes. La hauteur des pics est proportionnelle au nombre de nucléotides intégrés.

➤ Amplification par PCR

La PCR a été effectuée avec le kit PyroMark PCR Kit Qiagen. Le mélange réactionnel a été réalisé avec le Master Mix 1X, le tampon Coral Load 1X, UNG 1U/µL, désoxy UTP 4µM, MgCl₂ 4 µM, 0,3 µM des amorces *EGFR* sens et anti-sens biotinylées puis H₂O quantité suffisante pour un volume final réactionnel de 25µL.

Après ajout de 2 µl d'ADNg ou d'H₂O, le programme de PCR est effectué dans un thermocycleur Veriti 96 Well Applied Biosystem® :

- 25°C - 10 minutes (activation dNTP)
 - 95°C - 15 minutes
 - 95°C - 20 secondes
 - 53°C - 30 secondes
 - 72°C - 20 secondes
 - 72°C - 5 minutes
 - 8°C - ∞
- } 42 cycles

➤ Immobilisation des produits PCR

Les produits PCR biotinylés ont été immobilisés sur billes de sépharose. Dix µl du produit PCR ont été mélangés à 70 µl du mix suivant : 1µl de billes de sépharose streptavidine, 40 µl de Binding Buffer, 29 µl d'H₂O sur une plaque de PCR 24 puits. La plaque a ensuite été scellée puis agitée à température ambiante (entre 15 et 25°C) pendant 5 à 10 minutes à 1400 tr/min.

➤ Lavage et dénaturation

Cette étape est réalisée sur work station Qiagen.

Après mise de l'outil sous vide, les sondes à filtre sont plongées dans la plaque de PCR, pour capturer les billes contenant l'ADN matrice immobilisé. L'outil à vide est ensuite transféré successivement sur les cuves d'éthanol, de dénaturation et de lavage avec une purge des sondes à filtre entre chaque étape. Parallèlement, 0,8 µl d'amorce de séquence dilués dans du tampon d'hybridation PyroMark 1X, pour un volume total de 25 µl, sont ajoutés dans chacun des puits d'une plaque PyroMark Q24. Après fermeture de la commande de vide de l'outil, les billes sont relarguées sur la plaque PyroMark Q24 en plongeant les sondes à filtre dans le mélange d'amorce de séquençage dilué précédemment. La dénaturation est réalisée en plaçant la plaque PyroMark à 80°C pendant 2 minutes.

➤ Préparation de la cartouche d'injection des nucléotides et réaction de pyroséquençage

Les volumes de chaque dNTP, d'enzyme et de substrat nécessaires à la réaction sont calculés grâce au logiciel PyroMark Q24, en fonction de la séquence de distribution des nucléotides de l'essai (Figure 19) et ajoutés dans la cartouche PyroMark Q24. Après chargement de la cartouche et de la plaque dans l'automate PyroMark Q24, le pyroséquençage est effectué.

A1	
Type:	AQ
Assay:	EGFR Exon 21 codon 858 to 861
Sequence to Analyze:	CKGGCCAAACDGCTGGGTGCGGAAGAG
Dispensation Order:	GACTGCAGCATGCTG

Figure 19 Séquence de dispensation (injection) et d'analyse (K = G ou T ; D = A, G ou T)

III.2. Comparaison de la sensibilité et de la spécificité des méthodes d'analyses

III.2.1. Standards de référence commerciaux

Les standards de référence commerciaux Multiplex I cfDNA Reference Standard Set (Horizon Discovery, Cambridge UK) ont été utilisés pour comparer la sensibilité et la spécificité des différentes méthodes d'analyses. En plus des mutations d'intérêts, L858R et T790M ces standards contiennent 6 autres mutations à des fréquences alléliques connues (Tableau 9).

Gene	Variant	Expected Allelic Frequency (AF%)			
		5% Multiplex I	1% Multiplex I	0.1% Multiplex I	100% WT Multiplex I
EGFR	L858R	5.0	1.0	0.10	0.00
EGFR	ΔE746 - A750	5.0	1.0	0.10	0.00
EGFR	T790M	5.0	1.0	0.10	0.00
EGFR	V769 - D770insASV	5.0	1.0	0.10	0.00
KRAS	G12D	6.3	1.3	0.13	0.00
NRAS	Q61K	6.3	1.3	0.13	0.00
NRAS	A59T	6.3	1.3	0.13	0.00
PIK3CA	E545K	6.3	1.3	0.13	0.00

Tableau 9 Fréquences alléliques attendues pour les Multiplex I cfDNA Reference Standards à 5%, 1%, 0,1% et 100% Wild Type par PCR digitale(144).

III.2.2. Analyse par ARMS (Therascreen)

L'amplification spécifique d'allèle s'effectue par le biais du système ARMS (système de mutation réfractaire par amplification).

Cette technique utilise des amorces de PCR avec une extrémité 3' complémentaire de la mutation et pouvant différer d'un seul nucléotide. Lorsque l'amorce s'hybride par appariement complet (correspondance) des paires de bases, l'élongation est effectuée par l'ADN polymérase et l'amplification a lieu. En cas de mésappariement de la base à l'extrémité 3' de l'amorce, il ne se produit pas d'amplification significative (Figure 20) (127).

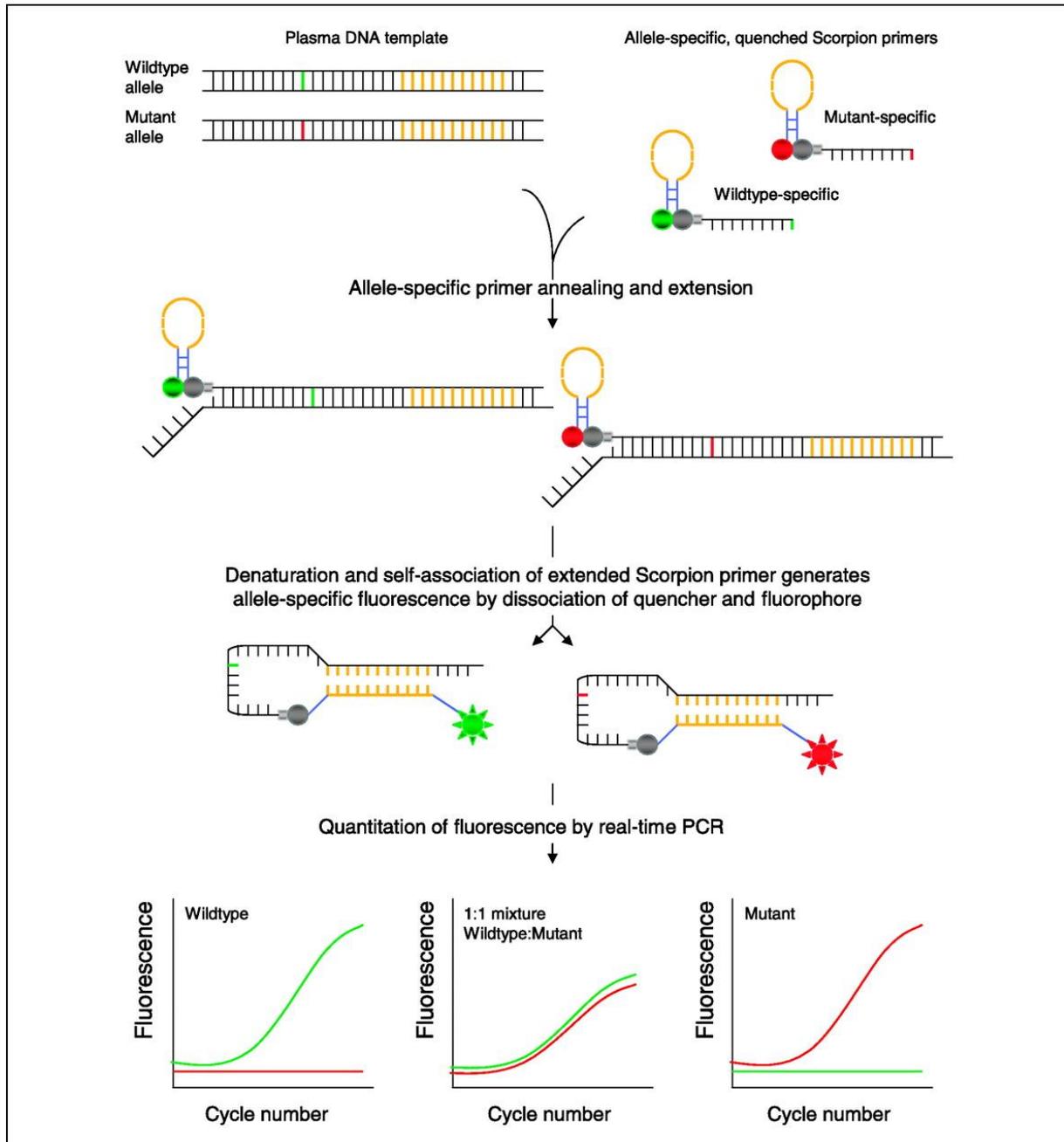


Figure 20 Amplification spécifique d'allèle par ARMS avec sondes Scorpions(145)

La détection de l'amplification s'effectue par le biais de la technologie des sondes Scorpions (146). Les sondes Scorpions sont des molécules bi-fonctionnelles contenant une amorce PCR

qui comporte une liaison covalente avec une sonde. Le fluorophore de cette sonde interagit avec un « quencher » intégré à la sonde et qui inhibe la fluorescence. Pendant la PCR, lorsque la sonde s'hybride sur sa cible, le fluorophore est libéré de l'inhibition du quencher et émet une fluorescence (Figure 21), qui est donc proportionnelle à la quantité de cible présente dans la réaction.

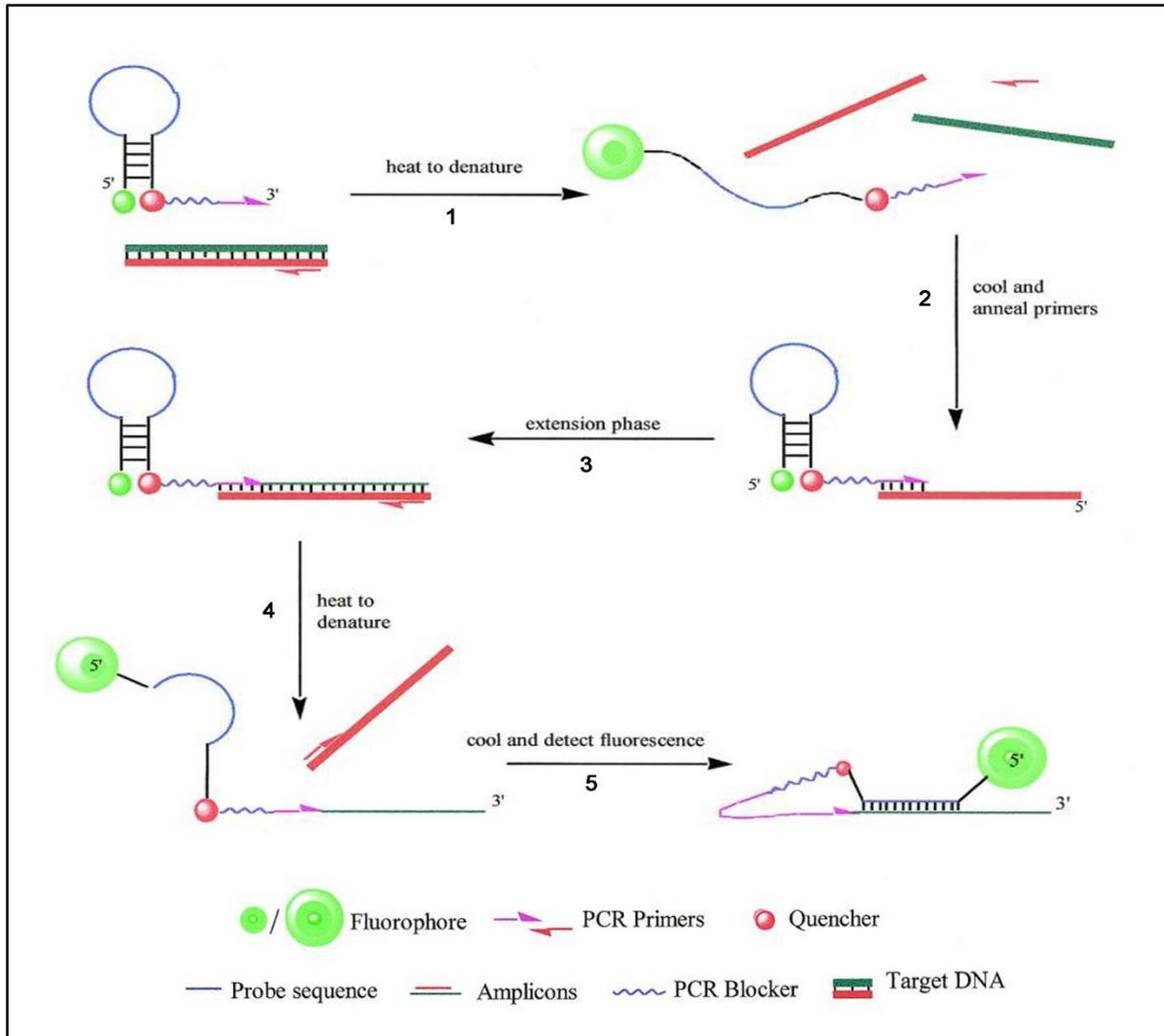


Figure 21 Mécanisme de fonctionnement d'une sonde Scorpion.

Etape 1 : Dénaturation initiale de la cible et de la séquence de la sonde Scorpion. Etape 2 : L'amorce attachée à la sonde scorpion se fixe à sa séquence complémentaire cible. Etape 3 : L'extension de l'amorce Scorpion produit un ADN double brin. Etape 4 : Dénaturation de l'ADN double brin produit à l'étape 3. Cela donne une molécule cible simple brin reliée avec une sonde Scorpion par l'intermédiaire de l'amorce. Etape 5 : Au refroidissement la séquence de la sonde Scorpion s'hybride sur sa cible par complémentarité des bases. Le fluorophore et le quencher se séparent, entraînant une augmentation détectable de la fluorescence (146).

Les échantillons ont été analysés en utilisant le Kit therascreen EGFR RGQ PCR selon le protocole du fournisseur (147).

Les mélanges réactionnels ont été réalisés en ajoutant 0,5 µl de Taq Polymerase dans 19,5 µl de chaque mix prêt à l'emploi (control reaction mix, L858R reaction mix et T790M reaction mix).

Chaque mélange réactionnel (control, L858R et T790M) a ensuite été complété par 5 µl d'H₂O, de contrôle positif ou de l'un des 4 témoins DNA Horizon, soit une masse de 21 ng pour ces derniers

L'analyse des échantillons est ensuite réalisée sur automate Rotor-Gene de PCR en temps réel avec le programme suivant :

- Dénaturation initiale et activation du système enzymatique : 95°C - 15 min
- 40 cycles de
 - 95°C - 30 secondes
 - 60°C - 60 secondes (acquisition des données de fluorescence)

Les manipulations ont été réalisées en duplicate.

III.2.3. Analyse par qPCR (Cobas)

Il s'agit d'une technique de PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR) qui utilise des sondes d'hydrolyse (Taqman®) (148) avec un relargage spécifique de la fluorescence lorsque l'allèle d'intérêt sur lequel se fixe la sonde est répliqué par la Taq polymérase.

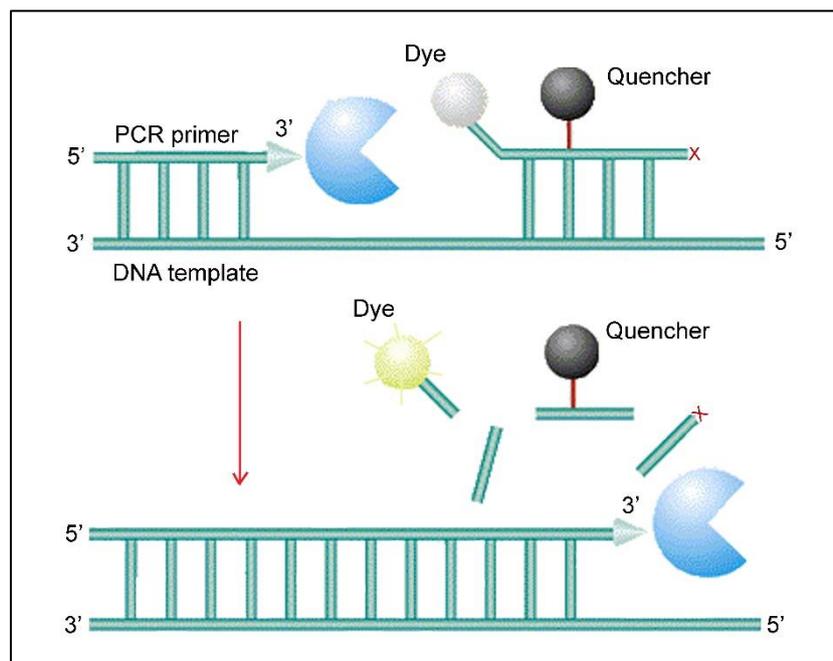


Figure 22 Fonctionnement des sondes d'hydrolyse (système Taqman®)

Chaque sonde TaqMan® est conçue de sorte à s'hybrider spécifiquement avec une région cible d'ADN simple brin. La Taq polymérase allonge l'amorce et synthétise le brin complémentaire du brin matrice, de 5' vers 3'. Au cours de cette élongation, la polymérase rencontre la sonde Taqman® marquée déjà hybridée au brin matrice et la dégrade grâce à son activité exonucléase 5'-3'. La dégradation de la sonde relargue le fluorophore cassant ainsi la proximité existant avec le quencher et permettant l'émission de la fluorescence (Figure 22). Ainsi, la fluorescence détectée est directement proportionnelle au relargage de fluorophore et donc à la quantité d'ADN d'intérêt présent dans le produit de PCR (148).

Les échantillons ont été préparés en utilisant le kit cobas® EGFR Mutation Test v2 (Roche, Meylan, France).

Après décongélation, les 3 mélanges réactionnels (1,2 et 3) sont réalisés par l'ajout de 20 µl de solution MMX et 5 µl de solution MGAC, puis répartis dans chaque puits d'une plaque à micropuits (plaque AD) en respectant la répartition d'un master mix par colonne selon la numérotation préconisée.

Vingt-cinq µl de EGFR Mix Control, de témoin négatif et 25 µl, soient 21 ng, des 4 témoins DNA Horizon ont ensuite été ajoutés dans les puits correspondants.

Après avoir été couverte à l'aide d'un film d'étanchéité, la plaque a été insérée dans l'automate Cobas Z 480 (Roche®) pour réaliser la réaction de PCR.

III.2.4. Analyse par séquençage-haut-débit (NGS)

Le principe du séquençage NGS (Next Generation Sequencing) est l'identification en temps réel des nucléotides incorporés par l'ADN polymérase, en parallèle pour une multitude de cibles d'ADN.

Le terme NGS est utilisé pour désigner les techniques de séquençage haut débit de deuxième génération et plus qui permettent un séquençage massif et parallèle.

III.2.4.1. Préparation des bibliothèques

La technique d'enrichissement utilisée ici est une méthode par amplicon, avec des mélanges d'amorces commerciaux, permettant d'amplifier un nombre relativement limité de gènes, en particulier celui de l'*EGFR*. Les bibliothèques ou bibliothèques d'ADN préparées permettent d'avoir une meilleure couverture et profondeur de lecture (nombre de « reads ») sur les zones d'intérêts.

Deux panels de gènes ont été testés : le kit AmpliSeq™ Colon and Lung Cancer Panel v.2 (Thermo Fisher Scientific, France) et le kit Oncomine™ Lung cfDNA Assay (Thermo Fisher Scientific, France).

III.2.4.1.1. Panel NGS Colon Lung Cancer

Le panel Ion AmpliSeq™ Colon and Lung Cancer v.2 utilisé cible 22 gènes impliqués dans le cancer du côlon et du poumon (Annexe 1) (136). Les principales étapes de la préparation des librairies sont résumées dans la Figure 23.

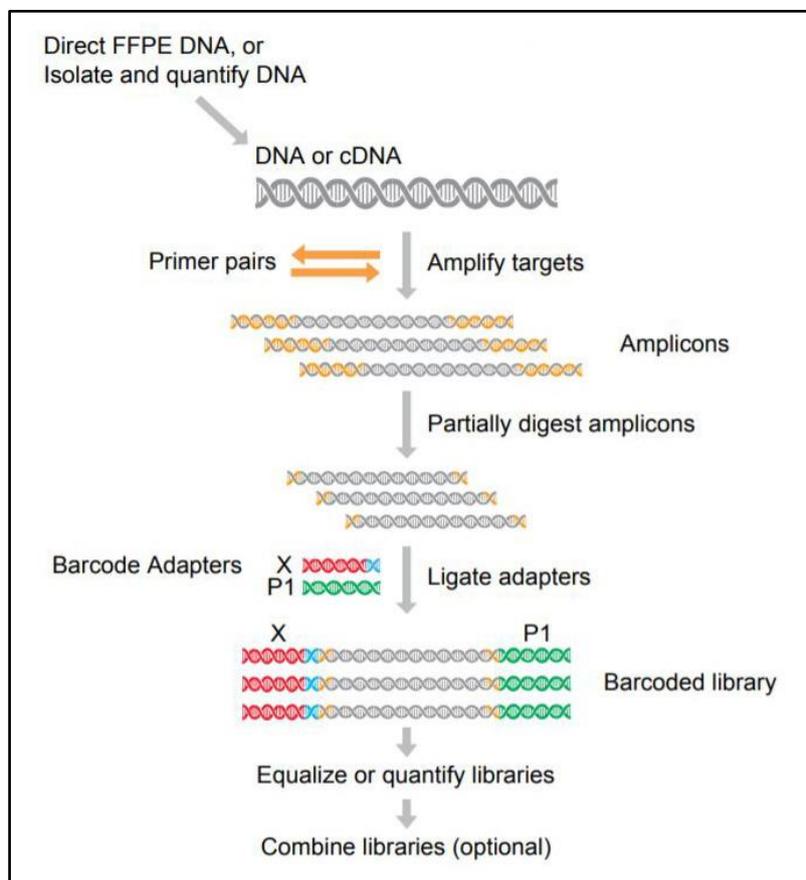


Figure 23 Préparation des librairies d'amplicon Ion torrent(149).

Amplification des cibles

L'amplification des gènes d'intérêt a nécessité pour chacun des 4 témoins DNA Horizon l'apport de 21 ng d'ADN (3 µL à 7 ng/µL), auxquels ont été ajoutés 2 µL de Ion Ampliseq™ HiFi Mix 5X et 5 µL de Ion Ampliseq™ Primer pool 2X pour un volume réactionnel de 10 µL.

Différents cycles de PCR (Polymerase Chain Reaction) ont ensuite été réalisés selon le protocole du fabricant détaillé ci-dessous afin d'amplifier les régions cibles.

- 99°C - 2 minutes
 - 99°C - 15 secondes
 - 60°C - 4 minutes
 - 10°C - ∞
- } 21 cycles

Digestion partielle des amorces

Pour chaque échantillon, 2 µL de FuPa Reagent ont été ajoutés puis un nouveau programme dans le thermocycleur a été effectué pour d'obtenir la digestion partielle des amorces. Ce programme comprenait 4 étapes uniques : une de 10 minutes à 50°C, une de 10 minutes à 55°C, une de 20 minutes à 60°C et une d'une heure maximum à 10°C.

Ligation des index et des adaptateurs

Afin de séquencer plusieurs bibliothèques sur une même puce (multiplexage), un index a été assigné à chaque échantillon. Ces index correspondent à des séquences uniques de 6 à 10 nucléotides. Ils permettent d'identifier l'échantillon et de repérer d'éventuelles contaminations. Pour réaliser la ligation de ces index aux amplicons, un mélange adaptateur/index a été effectué contenant : 0,5 µL de Ion P1 Adapter, 0,5 µL de Ion Xpress™ Barcode X (X correspondant au numéro de l'index choisit pour l'échantillon) et 1 µL d'eau sans nucléase. L'étape suivante a été l'ajout à chaque échantillon amplifié de 4 µL de Switch Solution, 2 µL de mélange adaptateur/index et 2 µL d'ADN Ligase. Les réactions de ligation ont été effectuées dans le thermocycleur selon le programme suivant : 30 minutes à 22°C, 5 minutes à 68°C, 5 minutes à 72°C et une heure maximum à 10°C.

Purification des bibliothèques

Les échantillons ont été mélangés avec 45 µL de billes Agencourt AMPure XP (BECKMAN COULTER, Villepinte, France) afin de pouvoir, sur un support magnétique, réaliser deux lavages successifs des billes sur lesquelles sont fixés les amplicons avec 150 µL d'éthanol à 70%.

Ces billes paramagnétiques fonctionnent avec la technologie solid-phase reversible immobilization (SPRI) (150) qui utilise un tampon optimisé pour lier sélectivement les fragments d'ADN de 100 pb et plus. Les amorces, nucléotides et enzymes en excès peuvent ainsi être éliminés par une simple procédure de lavage.

Amplification et quantification des bibliothèques

Une amplification supplémentaire des bibliothèques a été réalisée avec des amorces communes et complémentaires des adaptateurs liés précédemment aux amplicons. Pour cela, 50 µL de Platinum PCR SuperMix High Fidelity et 2 µL de Library Amplification Primer Mix ont été ajoutés à chaque échantillon puis les tubes ont été placés 5 minutes à 37°.

Le surnageant des tubes a été récupéré grâce à un support magnétique et placé dans le thermocycleur pour réaliser le programme suivant.

- 98°C - 2 minutes
 - 98°C - 15 secondes
 - 64°C - 1 minute
 - 10°C - ∞
- } 5 cycles

Cette amplification a été suivie de 2 étapes de purification des échantillons.

La première étape a été réalisée en ajoutant 25 µL de réactif AMPURE XP (volume d'échantillon 0,5X) avant passage sur le support magnétique pendant au moins 5 minutes puis récupération du surnageant.

La seconde étape a nécessité l'ajout de 60µL de réactif AMPURE XP (volume d'échantillon 1,2X) avant passage sur le support magnétique pendant 3 minutes, suivi de deux lavages par 150 µL d'éthanol à 70%.

Les bibliothèques ont ensuite été mélangées à 50 µL de Low TE et le surnageant récupéré.

Tous les échantillons ont été quantifiés avec le Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) à l'aide du kit Qubit® dsDNA HS Assay à partir de 10 µL de chaque échantillon.

III.2.4.1.2. Panel Oncomine Lung cfDNA

Le panel Oncomine Lung cfDNA Assay permet l'amplification et le séquençage de 11 gènes impliqués dans le cancer du poumon (141) selon le protocole du fournisseur (Annexe 2) .

Le panel Oncomine Lung cfDNA Assay est particulier : il inclut en plus l'ajout d'identifiants moléculaires uniques (UMI, UID) (140) introduits avant l'étape d'amplification par PCR, qui sont des séquences de nucléotides aléatoires uniques marquant distinctivement chaque copie d'ADN de l'échantillon initial afin de limiter les artefacts dus à la PCR et d'optimiser la sensibilité de détection d'un petit nombre de copies (Figure 24) (139).

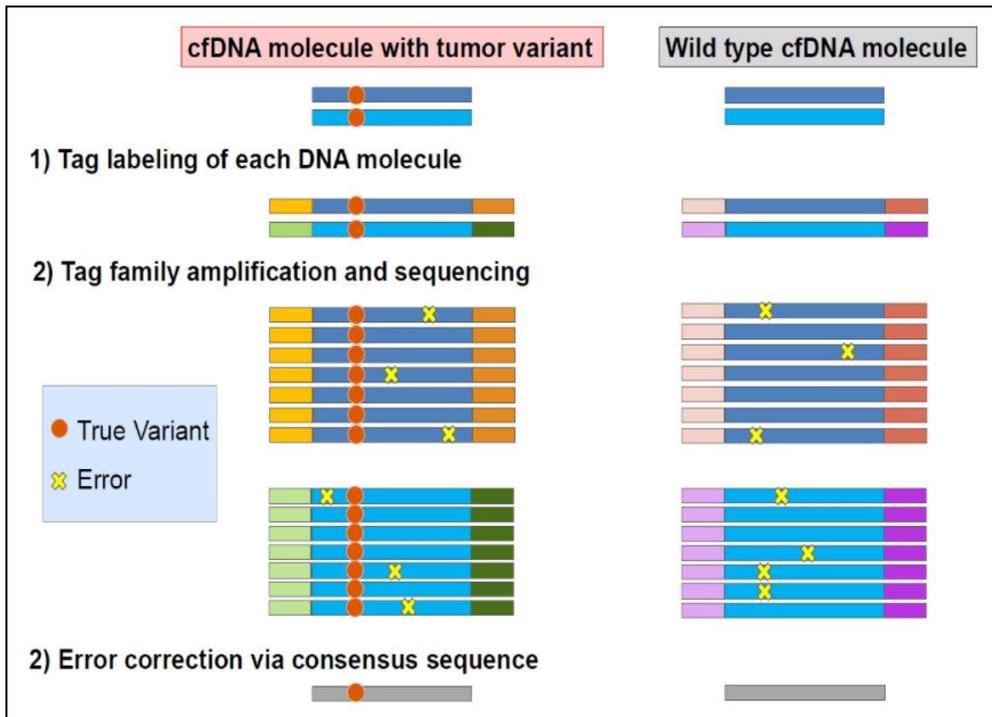


Figure 24 Identifiants moléculaires uniques permettant de marquer individuellement chaque molécule d'ADN avant amplification.

Amplification des cibles

L'amplification des gènes d'intérêt a nécessité l'apport de 21 ng d'ADN (3 μL à 7 $\text{ng}/\mu\text{L}$) complété par 10 μL d'eau nucléase free, auxquels ont été ajoutés 2 μL de cfDNA Panel et 15 μL de cfDNA Library PCR Master Mix pour un volume réactionnel de 30 μL .

Différents cycles de PCR (Polymerase Chain Reaction) ont ensuite été réalisés selon le protocole du fabricant détaillé ci-dessous afin d'amplifier les régions cibles.

- 98°C - 2 minutes
 - 98°C - 30 secondes
 - 64°C - 2 minutes
 - 62°C - 2 minutes
 - 60°C - 4 minutes
 - 58°C - 2 minutes
 - 72°C - 30 secondes
 - 72°C - 2 minutes
 - 4°C - ∞
- } 2 cycles

Purification des amplicons cibles

Les échantillons ont été mélangés avec 45 µL de billes Agencourt AMPure XP (BECKMAN COULTER) afin de pouvoir, sur un support magnétique, réaliser deux lavages successifs des billes sur lesquelles sont fixés les amplicons avec 150 µL d'éthanol à 80%. Les amplicons sont ensuite récupérés dans 23 µL de tampon low TE.

Amplification des amplicons cibles avec des amorces comportant des adaptateurs et ligation des index

Cette 2^{ème} étape de PCR a été réalisée en ajoutant les réactifs suivants à chaque échantillon : 1 µL de cfDNA Library Primer P1, 1 µL de Tag Sequencing BC # (# correspondant au numéro de l'index choisit pour l'échantillon) et 25 µL de cfDNA Library Master Mix pour un volume réactionnel de 50 µL.

La PCR a été effectuée dans le thermocycleur selon le programme suivant :

- 98°C - 2 minutes
 - 98°C - 15 secondes
 - 64°C - 15 secondes
 - 72°C - 15 secondes
 - 72°C - 5 minutes
 - 4°C - ∞
- } 5 cycles

Purification des librairies

Les échantillons ont été mélangés avec 57,5 µL de billes Agencourt AMPure XP (BECKMAN COULTER) afin de pouvoir, sur un support magnétique, réaliser deux lavages successifs des billes sur lesquelles sont fixés les amplicons avec 150 µL d'éthanol à 80%. Puis les amplicons sont récupérés dans 50 µL de tampon low TE.

Sélection de la taille de la librairie

Les échantillons ont été mélangés avec 50 µL de billes Agencourt AMPure XP (BECKMAN COULTER) afin de pouvoir, sur un support magnétique, réaliser deux lavages successifs des billes sur lesquelles sont fixés les amplicons avec 150 µL d'éthanol à 80%. Puis les amplicons sont récupérés dans 28 µL de tampon low TE.

Quantification et évaluation de la taille des librairies amplifiées

Tous les échantillons ont été quantifiés avec le Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) à l'aide du kit Qubit® dsDNA HS Assay à partir de 10 µL de chaque échantillon.

Puis 1µl de chaque échantillon a été préparé au moyen du Kit 2100 expert High sensitivity DNA Assay selon le protocole du fournisseur (151) et analysé dans l'automate d'électrophorèse capillaire Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent®, Ratingen, Allemagne). Les résultats sont donnés en taux de fluorescence en fonction de la taille des fragments en paires de bases.

Les premiers profils obtenus (Figure 25) montraient une importante quantité de «by product» (pics entre 130 et 160 bp) en plus des tailles de banques attendues aux alentours de 220 bp. Ces séquences sans intérêt filtrées lors de la PCR en émulsion peuvent impacter l'analyse au séquençage. Ces pics courts surnuméraires ont été éliminés par une nouvelle réalisation des étapes de purification et de sélection de la taille des bibliothèques précédemment décrites.

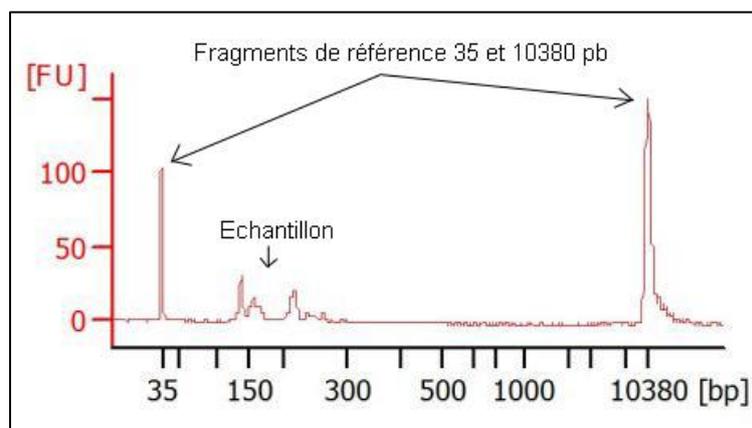


Figure 25 Profil Agilent initial

Après repurification le profil obtenu est similaire à ceux recommandés avec des tailles de banques aux alentours de 220 pb (Figure 26).

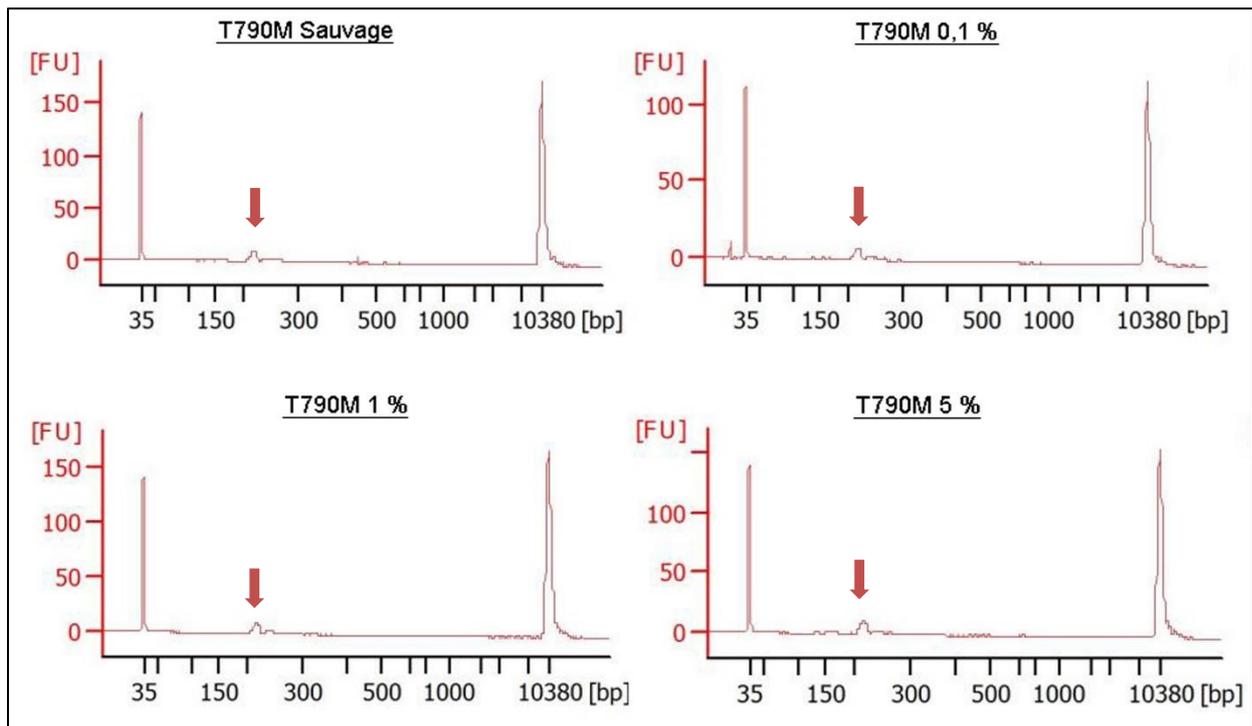


Figure 26 Profils Agilent pour les 4 standards DNA Horizon avec les tailles de pics attendus aux alentours de 220pb (flèches rouges)

III.2.4.2. Réaction d'amplification clonale par PCR en émulsion

Avant de procéder à la réaction de PCR en émulsion, les bibliothèques ont été diluées pour obtenir une concentration à 50pM (soit 7,5 ng/mL pour des amplicons allant jusqu'à 225 pb).

Cela a permis de réaliser un mélange équimolaire des bibliothèques, nécessaire à l'obtention d'un ratio idéal d'un fragment d'ADN par particule ISP (Ion Sphere™ particles, Thermo Fisher Scientific) pour chaque fragment d'ADN amplifié.

L'amplification clonale ainsi que le chargement de la puce ont été effectués par l'ingénieur en charge de l'unité de séquençage du CHU de Limoges (Genolim, Institut GEIST).

La PCR en émulsion a été réalisée à l'aide du kit Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200 (Thermo Fisher Scientific). Les bibliothèques ont d'abord été mélangées aux particules ISP et à un mix contenant les éléments nécessaires à la PCR puis le mélange a été placé dans le filtre de l'Ion OneTouch™ 2 System (Thermo Fisher Scientific). Lorsque la solution contenant les bibliothèques passe à travers le filtre, des microréacteurs contenant idéalement une sphère et un fragment d'ADN sont générés dans l'huile. La réaction de PCR se produit dans ces microréacteurs. Les sphères possèdent à leur surface des fragments d'ADN qui vont permettre la liaison des ADN synthétisés aux sphères via les adaptateurs P1. Chaque matrice est ainsi amplifiée de manière monoclonale à la surface d'une ISP afin de rendre les signaux détectables lors du séquençage (environ un million de copies d'un fragment d'ADN sur une sphère). Une étape

d'enrichissement des sphères est ensuite nécessaire pour éliminer celles ne contenant pas de fragment d'ADN à leur surface. Pour cela des billes magnétiques recouvertes de streptavidine sont utilisées. Les fragments d'ADN complémentaires de ceux liés aux sphères portent à leur extrémité une biotine. Le mélange des billes magnétiques avec le produit de la PCR grâce au couplage biotine / streptavidine permet de conserver uniquement les sphères portant des fragments d'ADN à leur surface. Puis une étape de dénaturation est effectuée pour éliminer les brins d'ADN portant la biotine. Les sphères obtenues sont recouvertes à leur surface d'ADN simple brin. Le fluorimètre Qubit 2.0 a permis de vérifier le chargement des sphères et de procéder au chargement de la puce lorsque le ratio de sphères liées à l'ADN sur les sphères non liées était suffisant (10 à 25%).

III.2.4.3. Chargement de la puce et réaction de séquençage

Le séquenceur utilisé est l'Ion Proton™ System (Thermo Fisher Scientific). Sa capacité de lecture est d'environ 10 giga bases par séquençage. La détection d'altérations somatiques nécessite une profondeur de lecture, c'est-à-dire un nombre de fois où chaque base est séquencée, d'environ 500 à 1000X.

La réaction de séquençage effectuée par l'Ion Proton est une technique de séquençage massivement parallèle, également appelée nouvelle génération, qui permet de regarder en même temps la réplication de milliers de fragments d'ADN. Elle repose sur un principe de technologie semi-conductrice (Ion Torrent™) basée sur les propriétés de l'ADN polymérase qui lorsqu'elle incorpore un nucléotide au brin d'ADN en cours de synthèse crée une liaison phosphodiester, entraînant la libération d'un proton (H⁺). Les sphères contenant les fragments d'ADN à séquencer sont chargées sur la puce Ion PI™ Chip v3 (Thermo Fisher Scientific). Cette puce contient 163 millions de micro-puits. Chaque puits va accueillir une sphère grâce à une brève étape de centrifugation. Ces micro-puits contiennent un milieu réactionnel ainsi qu'une couche mince pH-mètre au fond du puits. Des nucléotides non modifiés (A,T,C,G) sont successivement injectés dans chaque micro-puits. Lorsqu'un nucléotide est incorporé par la polymérase sur le principe de la complémentarité des bases, la libération d'un ion H⁺ entraîne une variation de pH dans le puits qui est détectée et transformée en signal numérique, finalement converti en base dans la séquence pour interprétation par l'utilisateur (152). Lorsque deux nucléotides identiques sont incorporés à la suite, le signal double et est alors enregistré en 2 bases identiques. Cependant cette interprétation n'est fiable que pour 5 à 6 nucléotides identiques successifs, cela peut donc être problématique lorsque des homopolymères à grands nombres de répétitions sont présents.

III.2.4.4. Analyse bio-informatique des données

III.2.4.4.1. Outils de filtration des données brutes

L'analyse par séquençage nouvelle génération permet de détecter une variation d'un seul nucléotide (SNV : single nucleotide variation), des insertions ou délétions de petite taille (INDELS) ainsi qu'une variabilité du nombre de copies d'un gène ou d'un locus donné (CNV : copy number variation).

Les rapports récupérés après chaque séquençage donnent des informations sur la qualité du séquençage : chargement de la puce, nombre de bases analysées, nombre total de lectures (« reads »), score de qualité relié à la probabilité d'erreurs d'identification d'une base (Phred Score)... afin de s'assurer de la validité des résultats.

Plusieurs étapes de transformation des données sont nécessaires avant de pouvoir les interpréter. Les signaux acquis par le séquenceur sont d'abord convertis en nucléotides (base calling) sous forme d'un fichier BCL (base call format). Puis le démultiplexage avec repérage des index et attribution des lectures à chaque échantillon permet de récupérer un fichier uBAM (unmapped Binary Alignment Map) sur le logiciel Torrent Suite Software (Thermo Fisher Scientific).

III.2.4.4.2. Traitement des données

Les fichiers uBAM sont ensuite chargés à l'aide d'un plugin ou manuellement sur le logiciel en ligne du fournisseur de chaque panel. Il s'agit du logiciel Sophia DDM (SophiaGenetics Bidart, France) pour le panel Ion AmpliSeq™ Colon and Lung Cancer Research v2 et de l'outil en ligne Ion Reporter (ThermoFischer Scientific) pour le Panel Oncomine™ Lung cfDNA Assay.

Lors de cette étape, les « reads » contenus dans les fichiers uBAM ont été alignés sur le génome de référence Hg 19 (human genome 19) grâce aux logiciels. Puis l'analyse bio-informatique a été restreinte aux régions ciblées par le panel. Le fichier généré après alignement est un fichier BAM (binary alignment map).

A partir des interfaces logicielles qui permettent une première visualisation des variants observés, les résultats ont directement été rendus sous la forme de tableau regroupant les variants retrouvés par rapport au génome de référence et téléchargeable au format .tsv pour une ouverture sous excel.

III.2.5. Analyse par ddPCR (Droplet Digital PCR)

III.2.5.1. Principe

La PCR digitale consiste à partitionner un échantillon en un grand nombre de chambres de réaction contenant chacune une seule ou aucune copie de la séquence d'ADN d'intérêt (128). La concentration de la séquence d'intérêt est ainsi augmentée dans le volume réactionnel du compartiment par rapport à sa concentration de départ (Figure 27) (153).

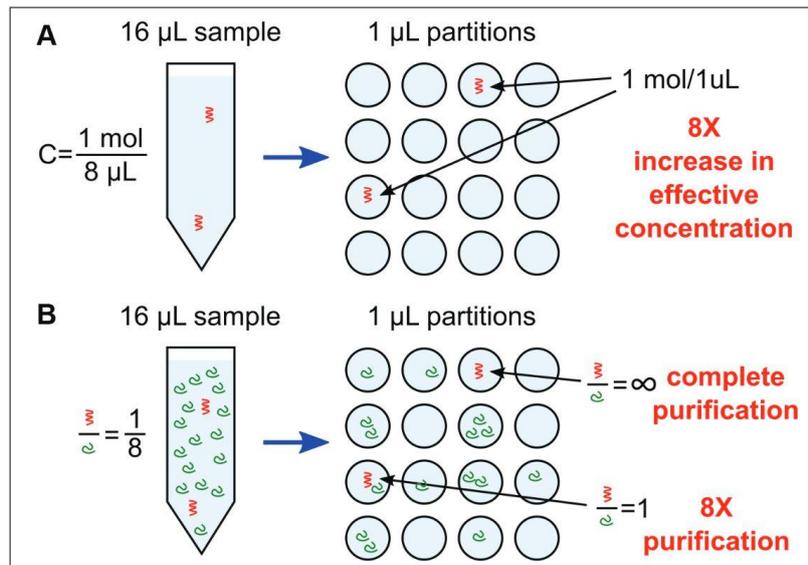


Figure 27 Avantages du partitionnement dans les dosages numériques. (A) augmentation de la concentration efficace et (B) effet d'enrichissement, c'est-à-dire réduction des composés interférents comme par exemple l'ADNg non muté (153).

Le partitionnement peut se faire dans une chambre de réaction (cdPCR ou chamber digital PCR). Dans la droplet digital PCR (ddPCR), la PCR se fait en émulsion partitionnée dans des milliers de gouttelettes contenant 1 nanolitre qui constituent autant de chambres de réaction (154). Chaque compartiment est ensuite le siège d'une PCR allèle spécifique par sonde d'hydrolyse (Taqman®) unique et isolée des autres compartiments. Chaque gouttelette (pour la ddPCR) passe ensuite dans un détecteur qui fait une mesure numérique (digitale) de la présence ou l'absence de signal (Figure 28).

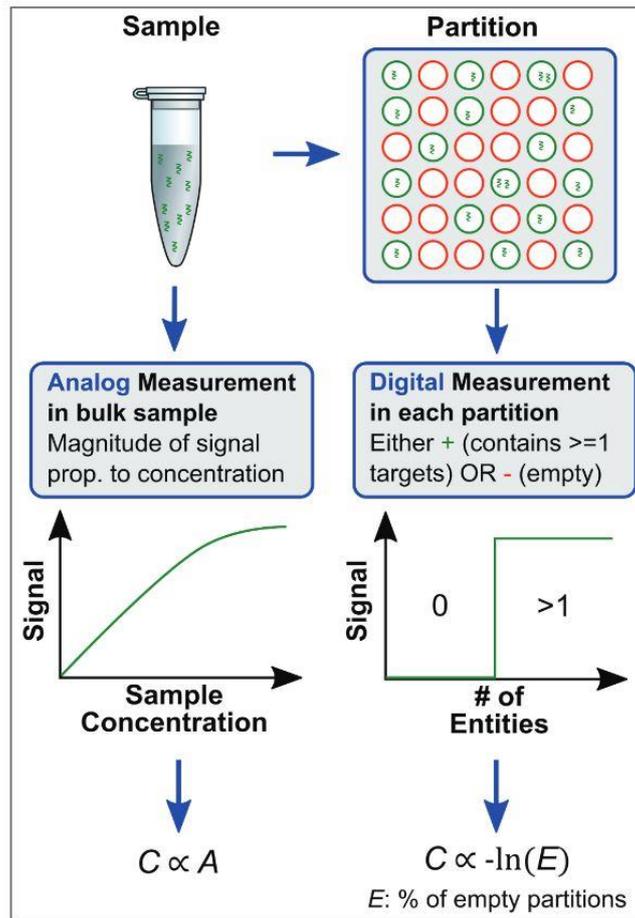


Figure 28 Comparaison des dosages numériques et des dosages biologiques analogiques conventionnels (153).

La distribution statistique de l'ADN dans les compartiments est estimée par la loi de Poisson, qui régit les statistiques d'événements rares (155). Ainsi en comptant le nombre de partitions « positives » (dans lesquelles la séquence d'intérêt est détectée) et le nombre de partitions « négatives » (dans lesquelles elle ne l'est pas), la loi de Poisson permet de déterminer combien de molécules d'ADN d'intérêt étaient présentes dans l'échantillon initial (156).

III.2.5.2. Protocole

Les échantillons ont été analysés à l'aide du kit TaqMan dPCR Liquid Biopsy Assays (LIFE TECHNOLOGIES) avec des sondes TaqMan® T790M EGFR DPCR Assay (Figure 29) selon le protocole du fournisseur (157). Ce kit ne permet pas de rechercher simultanément l'autre mutation d'intérêt L858R.

Gene:	EGFR
Transcript:	NM_005228.3
Assay Name:	EGFR_6240
COSMIC ID:	6240
Nucleotide Mutation:	c.2369C>T
Amino Acid Change	p.T790M
Mutation genome location:	chr.7 55181378 on build GRCh38
Assay gene location:	Within Exon 22
Context Sequence [VIC/FAM]:	CTCACCTCCACCGTGCAGCTCATCA[C/T]GCAGCTCATGCCCTT CGGCTGCCTC
Assay transcription exon location:	Within Exon 20

Figure 29 Caractéristique des sondes Taqman® EGFR T790M DPCR (158).

Les mélanges réactionnels ont été réalisés en ajoutant 1,1 µL de T790M Assay 20X, 11 µL de Supermix for probe 2X et 9,9 µL (20 ng) de témoins DNA Horizon.

Après agitation, le mélange a été incubé 3 minutes à température ambiante puis transféré sur les puits dédiés de la cartouche DG8 de génération des gouttelettes. Soixante-dix µL d'huile de génération de gouttelettes (Droplet generation oil) ont ensuite été ajoutés dans chacun des puits dédiés à l'huile (Figure 30).



Figure 30 Cartouche DG8™ de génération des gouttelettes

Après avoir placé le couvercle sur la cartouche, elle a été chargée sur le QX200™ droplet generator (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) pour procéder à la génération des gouttelettes. Ce dernier utilise un système de microfluides pour combiner l'huile et l'eau (échantillons), ce qui permet de partitionner chaque échantillon en environ 20000 gouttelettes d'un volume de 1 nanolitre.

Une fois la génération de gouttelettes terminée, 40 µL ont été transférés sur une plaque 96 puits qui a été sellée immédiatement pour éviter l'évaporation au moyen d'une feuille de métal avec le PX1™ PCR Plate Sealer.

La PCR s'est déroulée selon le programme suivant :

Etape	Température	Rampe de T°	Temps
Unique	95°C	2°C/sec	10 minutes
40 cycles	94°C	2°C/sec	30 secondes
	60°C	2°C/sec	1 minute
Unique	98°C	2°C/sec	10 minutes
Unique	4°C	1°C/sec	Prolongé

Les échantillons ont ensuite été analysés sur le QX100™ Droplet Reader (Bio-Rad.). Cet appareil analyse chaque gouttelette individuellement en utilisant un système de détection à deux couleurs, les gouttelettes positives et négatives sont comptées pour fournir une quantification absolue de l'ADN cible.

Pour notre analyse, nous avons paramétré l'appareil, avec l'application QuantaSoft™ fournie avec l'appareil, sur une détection des fluorescences FAM et VIC correspondant aux sondes Taqman® du kit Assay T790M.

III.3. Etude rétrospective par ddPCR de biopsies liquides et tissulaires initialement négatives pour la mutation T790M chez 10 patients

Nous avons recherché la présence de la mutation de résistance T790M chez des patients pour lesquels elle n'avait pas été détectée par la technique de routine mais qui présentaient une mutation activatrice d'*EGFR* et une récurrence sous ITK.

Pour ce faire nous avons ré-analysé les biopsies liquides et tissulaires initialement négatives de 10 patients pour la mutation T790M, en utilisant la technique combinant au mieux une sensibilité satisfaisante et une rapidité de mise en oeuvre au vu de la deuxième partie de notre étude (cf paragraphe IV.2).

III.3.1. Données cliniques, histopathologiques et biologiques

Les 22 échantillons de plasmas et biopsies tissulaires sélectionnés proviennent de 11 patients atteints de CBNPC, prélevés et biopsiés au Centre Hospitalier Universitaire de Limoges entre

2016 et 2018. Le diagnostic de ces tumeurs avait été établi après étude au microscope optique par un pathologiste selon la classification 2015 des tumeurs du poumon (2).

Les critères d'inclusions étaient : la présence d'une mutation activatrice d'*EGFR*, l'existence d'une récurrence clinique sous ITK, la présence de plasma et/ou d'ADN extrait à partir de tissu FFPE, non épuisés après les analyses initiales et l'absence de détection d'une mutation T790M par les techniques de routine initiales sur ces échantillons.

Les résultats initiaux négatifs avaient été obtenus en utilisant la technique ARMS (Therascreen) ou qPCR (Cobas) pour la recherche des mutations sur l'ADNtc et les biopsies tissulaires.

Les échantillons, ainsi que les données cliniques qui leur sont associées ont été mis à disposition par le Centre de Ressources Biologiques du CHU de Limoges (CRBiolim) après validation du projet par le comité scientifique et vérification de l'absence de non – opposition du patient pour l'utilisation de leur prélèvement à des fins de recherche.

III.3.2. Analyse moléculaire

III.3.2.1. Biopsies liquides

Les 10 échantillons de plasma analysés correspondent au plasma non utilisé sur l'analyse initiale qui a été congelé et conservé à -80°C dans la tumorothèque (CRB) de la plateforme de génétique moléculaire du cancer (PGMC).

Le plasma avait été obtenu à partir d'un échantillon sanguin selon le protocole décrit au chapitre III.1.3.

L'extraction a été réalisée avec le kit Promega Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit (Promega, Madison, USA) selon le protocole du fournisseur (143) décrit au chapitre III.1.4.

Après transfert des tubes d'élutions correspondant au même échantillon initial dans un même tube, l'ADN a été quantifié grâce au Quantus Fluorometer.

III.3.2.2. Biopsies tissulaires

Pour les 10 échantillons tissulaires, nous avons utilisé l'ADN disponible de l'analyse initiale et congelé à -80°C.

Les biopsies tissulaires ont été incluses initialement en paraffine après fixation dans du formol pendant 12 à 24h. Pour chaque cas, une lame d'HES représentative de la tumeur, avec un secteur contenant au moins 10% de cellules tumorales, a été sélectionnée après étude au

microscope optique par un pathologiste. Environ 10 mg de tissu ont été prélevés par grattage du bloc de paraffine dans la zone d'intérêt sélectionnée sur la lame d'HES.

L'extraction a été réalisée avec le kit Promega® Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit (Promega) dans l'automate d'extraction Maxwell 16 (Promega). Les échantillons ont d'abord été incubés avec 20 µL de Protéinase K et 180 µL de Tampon d'incubation pendant 2h à 70°C. Puis 400 µL de tampon de lyse ont été ajoutés. Après centrifugation, les échantillons ont été déposés dans les cartouches de l'automate. Les échantillons ont alors été récupérés dans des tubes contenant 70 µL de solution d'élution puis quantifié à l'aide du fluorimètre Quantus.

Les analyses sont ensuite réalisées en utilisant la technique combinant au mieux une sensibilité satisfaisante et une rapidité de mise en oeuvre selon le protocole décrit dans la deuxième partie de notre étude (cf paragraphe III.2).

IV. Résultats

IV.1. Comparaison des performances des tubes de prélèvements EDTA et Roche

Les résultats du pyroséquençage sont présentés sous forme de pyrogramme montrant le pourcentage d'allèle *EGFR* muté, c'est à dire le pourcentage de codon CGG comparativement au pourcentage de codon CTG de référence. Le seuil ou LOD (Limit Of Detection) a été placé à 4 % pour définir la présence de la mutation L858R sur l'exon 21 d'*EGFR*.

L'objectif de cette partie de l'analyse est de montrer à partir de quelle durée de stockage, l'ADNg sauvage provenant des leucocytes ayant éclaté masque la présence de l'allèle muté. Les valeurs obtenues pour les différentes conditions sont toujours comparées aux témoins négatifs et positifs (Figure 31).

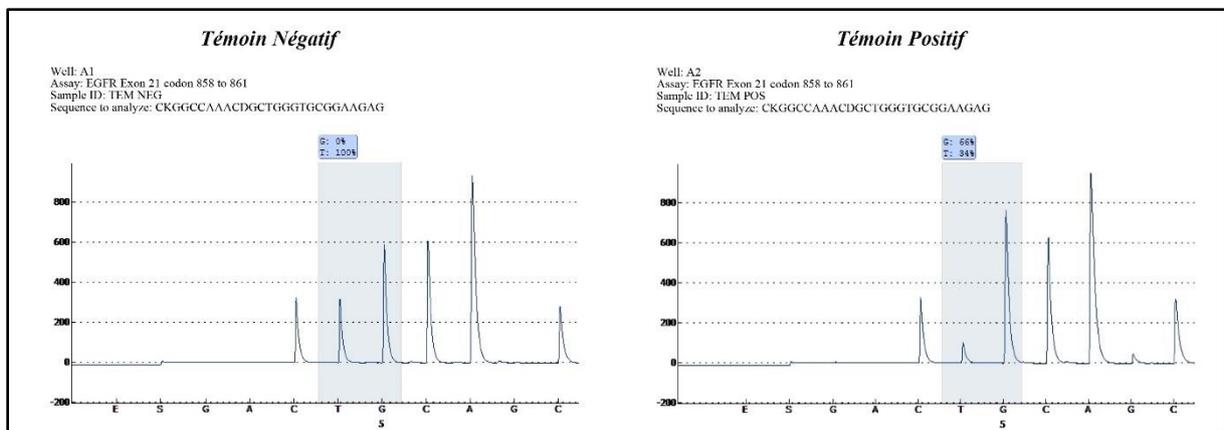


Figure 31 Pyrogrammes des témoins négatif et positif de la mutation *EGFR* L858R. Le témoin positif correspond à de l'ADN génomique extrait de cellules H1975 présentant une triploïdie, soit deux copies d'allèle *EGFR* muté L858R et une copie d'allèle sauvage, visualisables sur le pyrogramme par des fréquences alléliques de 66% et 33% respectivement.

Pour chaque échantillon, 3 profils de détection ont pu être observés (Figure 32). Le premier profil est similaire au témoin négatif et correspond à l'absence de mutation. Le deuxième profil est similaire au témoin positif mais avec une fréquence allélique moindre qui reste cependant supérieure au seuil de 4% et correspond à la présence de la mutation L858R. Enfin le dernier profil intermédiaire entre les deux précédents correspond à la détection de la mutation à une fréquence allélique inférieure à notre seuil de 4 %, pouvant donc correspondre à des erreurs de détection et est considéré comme non significatif.

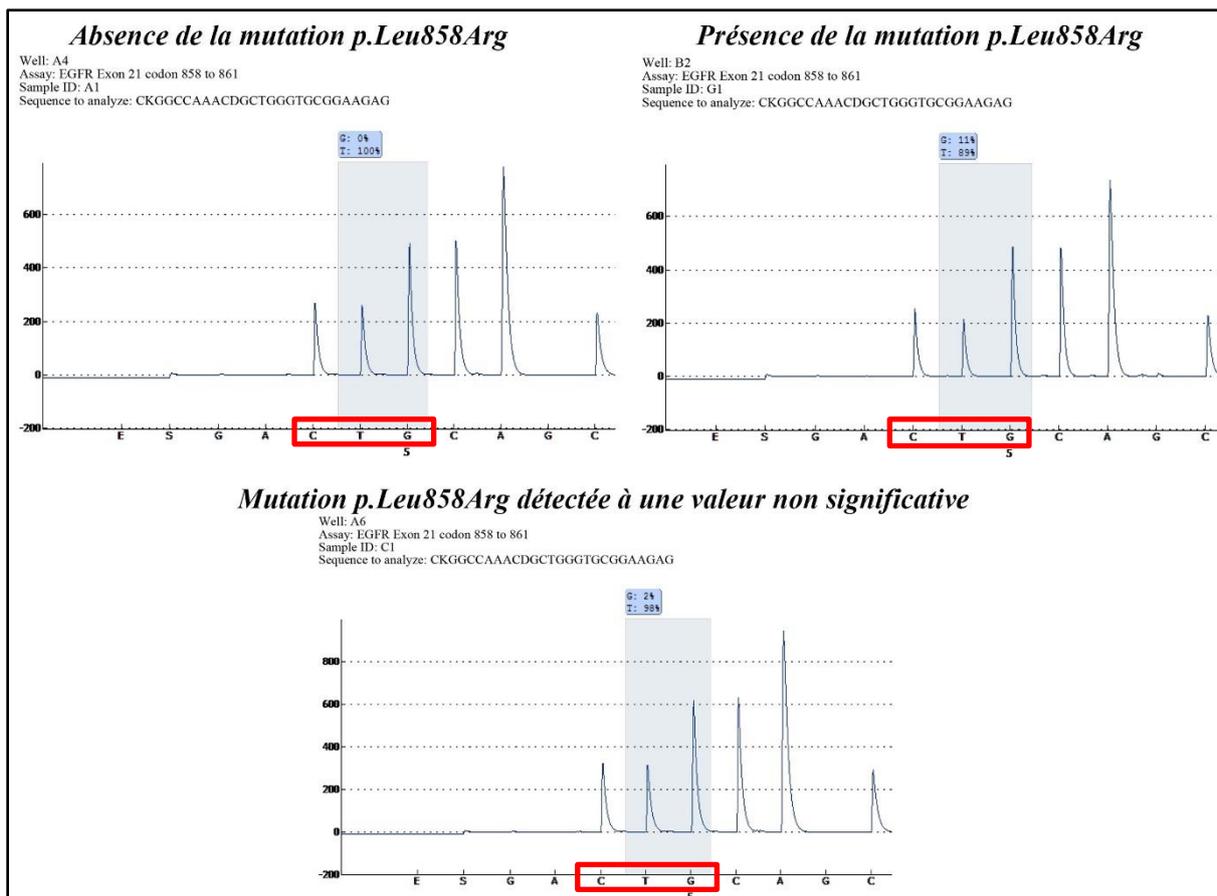


Figure 32 Pyrogrammes des différents profils de détection observés. Le triplet de nucléotides CTG correspondant à la leucine 858 est encadré en rouge

Les valeurs de pourcentage d'allèle muté retrouvées pour chaque échantillon sont résumées dans le Tableau 10.

Les analyses ont été réalisées 4 fois pour vérifier la validité de la procédure. Pour chacune des analyses les témoins de manipulation présentaient des valeurs correctes de 0 à 1 % d'allèle muté, soit un bruit de fond inférieur à la LoD pour le témoin négatif, et de 64% pour le témoin positif comme attendu.

Manipulation	Tube	J0 TEM Neg	J0	J3	J7	J10
N°1	EDTA	2	10	2	4	2
	Roche	2	6	17	19	20
N°2	EDTA	0	9	2	0	0
	Roche	0	11	11	1	1
N°3	EDTA	0	15	5	0	0
	Roche	0	15	19	14	3
N°4	EDTA	0	11	5	0	0
	Roche	0	18	18	15	13

Tableau 10 Fréquences alléliques de la mutation L858R détectées dans l'ADNtc des plasmas en fonction du tube de collection et du temps de conservation par Pyroséquençage. Les résultats atteignant le seuil de positivité de 4% sont représentés en chiffres gras.

Les résultats du pyroséquençage ont permis d'établir un graphique donnant la variation de fréquence de la mutation L858R en fonction du temps de conservation (Figure 33). Ils montrent que les tubes Roche permettent de détecter la mutation L858R après J3 et jusqu'à J10 alors qu'elle n'est plus détectable dans les tubes EDTA. Les tubes Roche permettent de maintenir une fréquence allélique relativement stable jusqu'à J3 mais celle-ci décroît entre J3 et J10.

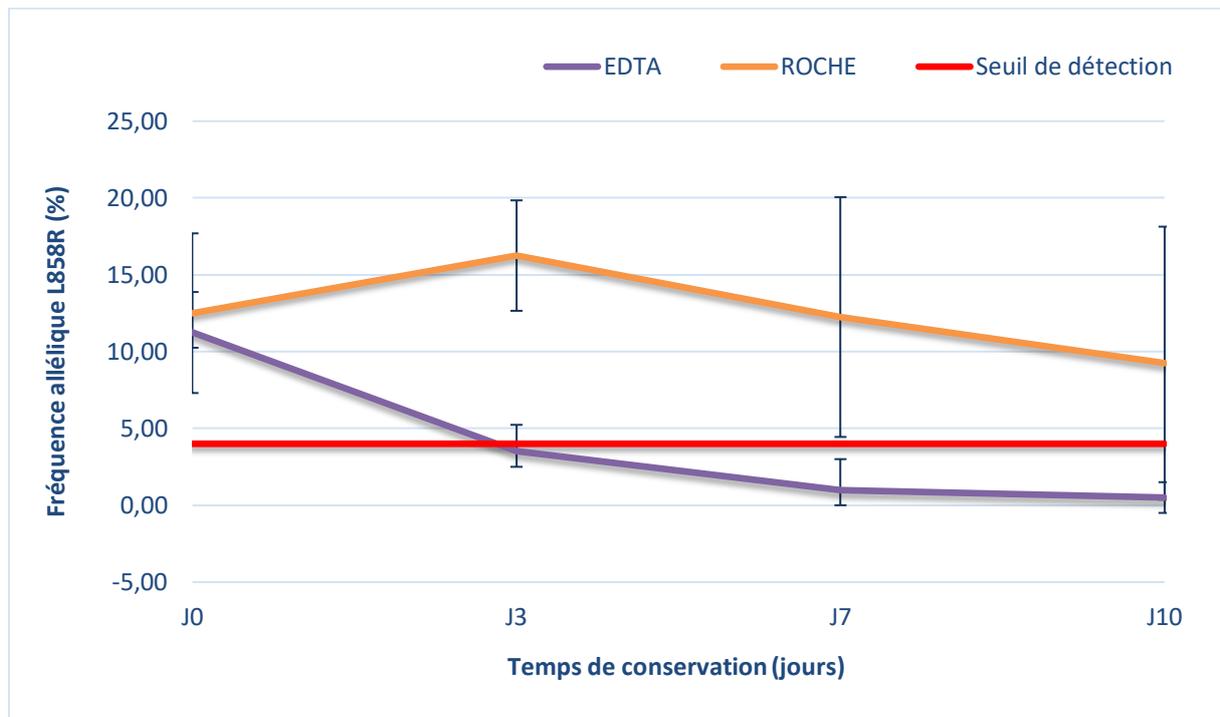


Figure 33 Fréquence allélique moyenne de la mutation L858R détectée par pyroséquençage en fonction du temps de conservation des tubes.

IV.2. Comparaison de la sensibilité et de la spécificité des méthodes d'analyse

IV.2.1. Analyse par ARMS (Therascreen)

La sensibilité de cette méthode a été analysée pour deux cibles : les mutations L858R et T790M de l'*EGFR*.

A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée par un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle au nombre d'amplicons produits. Le seuil de fluorescence a été fixé à 0,075 comme indiqué par le fabricant. Le logiciel interprète l'amplification comme positive si la courbe dépasse ce seuil avant 40 cycles de PCR. Le moment où la courbe atteint le seuil en nombre de cycles définit le Cycle Threshold (C_T).

Les résultats sont présentés sous forme de courbe d'amplification pour l'ADN avec la mutation *EGFR* L858R (Figure 34) et pour l'ADN avec la mutation *EGFR* T790M (Figure 35).

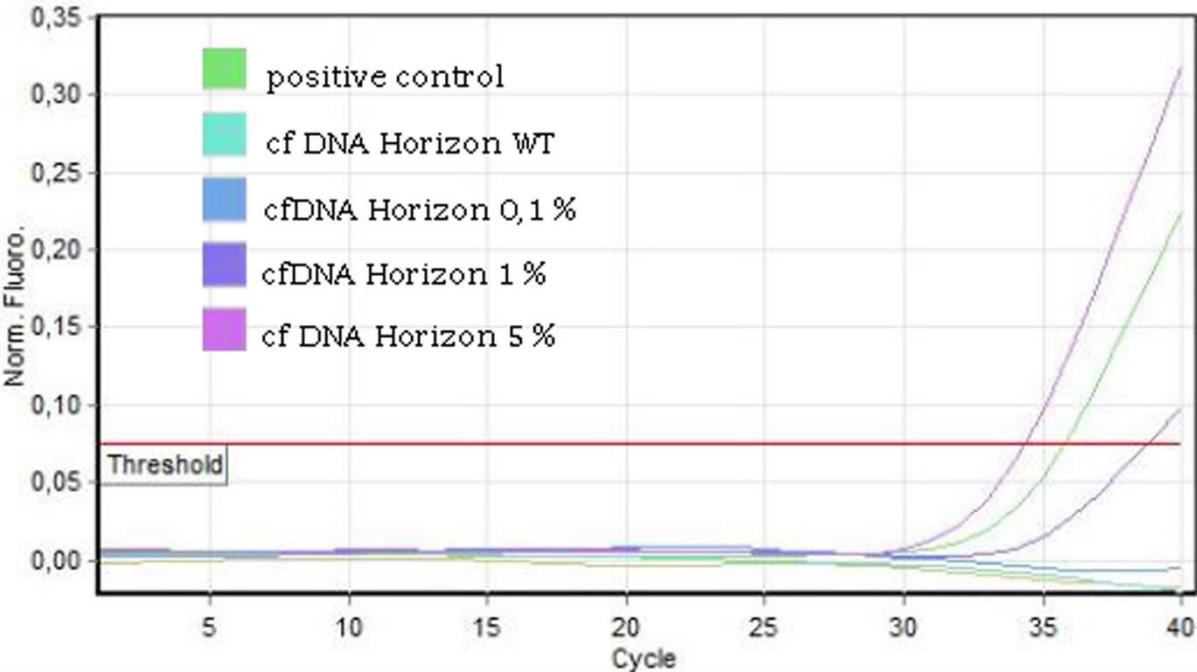


Figure 34 Courbes d'amplification pour la mutation *EGFR* L858R par la technique ARMS (Therascreen).

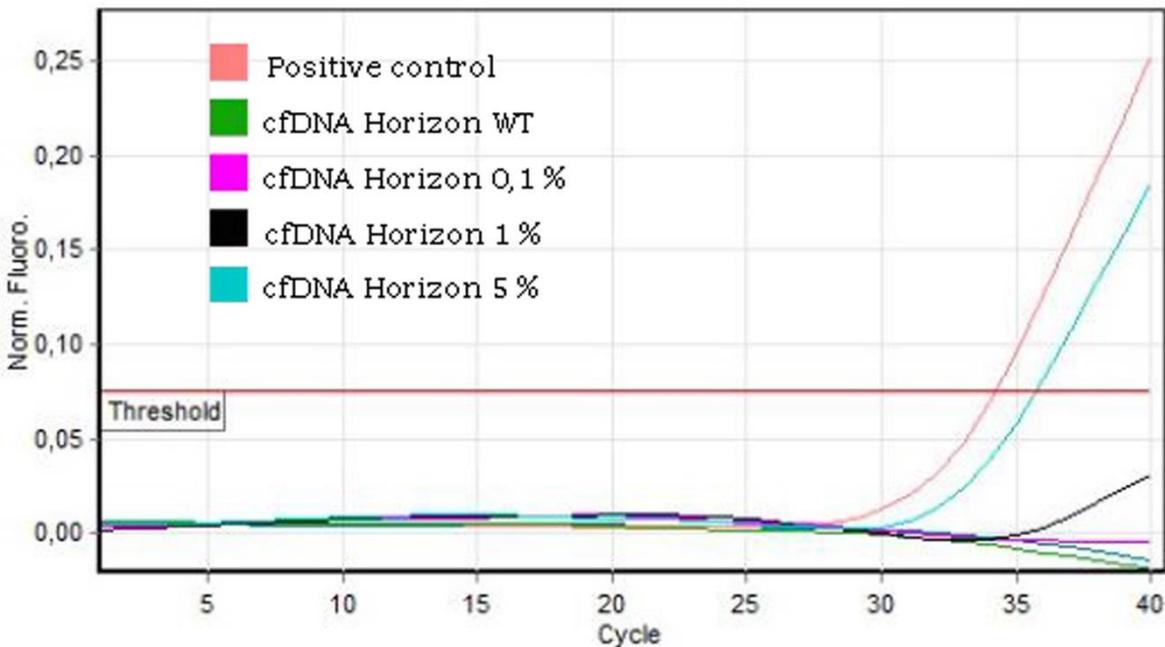


Figure 35 Courbes d'amplification pour la mutation *EGFR* T790M par la technique ARMS (Therascreen)

Les manipulations ont été réalisées 2 fois, les résultats sont regroupés dans le Tableau 11.

Cible analysée	Manipulation	Témoins DNA horizon			
		WT	0,1 %	1 %	5 %
L858R	1	nd	nd	34,84	33,15
	2	nd	nd	38,75	34,38
T790M	1	nd	nd	35,77	32,79
	2	nd	nd	nd	35,71

Tableau 11 Résultats ARMS Therascreen exprimés en C_t (Cycle Threshold) en fonction de la mutation recherchée et de sa fréquence allélique. Nd : Non détecté

Cette technique est plus sensible en ce qui concerne la mutation L858R. En effet, elle permet de mettre en évidence la mutation d'intérêt L858R aux fréquences alléliques de 1 % et 5 %, alors que la mutation T790M n'est détectée de manière reproductible qu'à la fréquence de 5%. Aucune de ces deux mutations ne sont détectées à une fréquence allélique de 0,1%.

IV.2.2. Analyse par qPCR par la méthode CE/IVD cobas® EGFR Mutation Test v2

Les résultats de l'analyse par qPCR avec le kit commercial CE/IVD cobas® EGFR Mutation Test v2 sont directement fournis par le logiciel d'analyse sous la forme de tableaux (Tableau 12 et Tableau 13) mentionnant la ou les mutations mises en évidence sur les échantillons analysés. Les manipulations ont été réalisées à deux reprises.

Position	Sample ID	Kit	Result 1	Result 2
C01:C02:C03	WT	1	Mutation Detected	G719X
D01:D02:D03	cfDNA HORIZON 0,1 %	1	Mutation Detected	Ex19Del G719X
E01:E02:E03	cfDNA HORIZON 1 %	1	Mutation Detected	Ex19Del L858R T790M G719X
F01:F02:F03	cfDNA HORIZON 5 %	1	Mutation Detected	Ex19Del L858R T790M G719X Ex20Ins

Tableau 12 Résultats qPCR Cobas (1^{ère} manipulation)

Position	Sample ID	Kit	Result 1	Result 2
E01:E02:E03	WT	1	Mutation Detected	G719X
F01:F02:F03	cfDNA HORIZON 0,1 %	1	Mutation Detected	Ex19Del G719X
G01:G02:G03	cfDNA HORIZON 1 %	1	Mutation Detected	Ex19Del L858R T790M G719X Ex20Ins
H01:H02:H03	cfDNA HORIZON 5 %	1	Mutation Detected	Ex19Del L858R T790M G719X Ex20Ins

Tableau 13 Résultats qPCR Cobas (2^{ème} manipulation)

Cette technique permet de mettre en évidence les mutations d'intérêts L858R et T790M aux fréquences alléliques de 1 % et 5 %, mais ne détecte pas ces mutations à une fréquence allélique de 0,1%.

La technique permet également de mettre en évidence avec des sensibilités différentes d'autres mutations de fréquence allélique variable, également présentes dans le témoin cfDNA Horizon (144). La mutation Ex20Ins, qui correspond à la mutation V769_D770insASV (159), est détectée de façon similaire aux mutations d'intérêts.

En revanche, la sensibilité de détection de la méthode est meilleure en ce qui concerne la mutation Ex19Del qui correspond à la mutation p.E746_A750del (160), détectée quelle que soit la fréquence allélique.

Enfin la présence de la mutation G719X sur tous les échantillons est probablement due à sa présence dans l'ADNg du type cellulaire ayant servi de diluant pour préparer les différents témoins DNA Horizon (161).

IV.2.3. Analyse par NGS

IV.2.3.1. Panel Colon Lung

Après traitement des données, les résultats des analyses sont rendus sous la forme de tableurs excel téléchargeable à partir du logiciel d'analyse bioinformatique Sophia DDM. Les manipulations ont été réalisées 4 fois et leurs résultats sont résumés dans le Tableau 14.

Gene	c.DNA	Protéine	Fréquence allélique attendue	Manipulation			
				1	2	3	4
EGFR	c.2573T>G	p.Leu858Arg	0	nd	nd	nd	nd
			0,1	nd	nd	nd	nd
			1	1,14	nd	nd	nd
			5	3,15	nd	3,37	2,76
	c.2369C>T	p.Thr790Met	0	nd	nd	nd	nd
			0,1	nd	nd	nd	nd
			1	1,09	nd	nd	nd
			5	2,38	4,76	4,37	4,24
	c.2235_2249delG GAATTAAGAGAA GC	p.Glu746_Ala750de l	0	nd	nd	nd	nd
			0,1	nd	nd	nd	nd
			1	1,87	1,99	1,47	1,65
			5	8,26	4,1	3,9	5,27
	c.2300_2308dupC CAGCGTGG	p.Ala767_Val769du p	0	nd	nd	nd	nd
			0,1	nd	nd	nd	nd
			1	nd	nd	nd	nd
			5	3,23	nd	2,09	2,51

Tableau 14 Résultats NGS Colon Lung pour les mutations d'EGFR exprimés en fréquence allélique(%). Nd : non détecté

Cette technique permet de mettre en évidence les mutations L858R et T790M à une fréquence de 5%, même si, pour la mutation L858R cette détection n'est pas reproductible à cette fréquence puisqu'une manipulation (n°2) sur les 4 ne la détecte pas. Le NGS Colon Lung n'est pas assez sensible pour permettre de détecter de manière reproductible ces mutations aux fréquences alléliques de 1% et 0,1%.

Le panel NGS Colon Lung nous a permis d'analyser simultanément d'autres mutations sur des gènes différents. Pour les autres mutations présentes dans les témoins cfDNA Horizon et indiquées par le fournisseur, les résultats sont présentés dans le Tableau 15.

Gene	c.DNA	Proteine	Fréquence allélique attendue	Manipulation			
				1	2	3	4
KRAS	c.35G>A	p.Gly12Asp	0	nd	nd	nd	nd
			0,13	nd	nd	nd	nd
			1,3	nd	nd	nd	nd
			6,3	5,23	3,99	3,79	4,13
NRAS	c.181C>A	p.Gln61Lys	0	nd	nd	nd	nd
			0,13	nd	nd	nd	nd
			1,3	nd	nd	nd	nd
			6,3	5,48	5,23	5,3	4,52
	c.175G>A	p.Ala59Thr	0	nd	nd	nd	nd
			0,13	nd	nd	nd	nd
			1,3	nd	nd	nd	nd
			6,3	4,84	3,94	3,7	4,01
PIK3CA	c.1633G>A	p.Glu545Lys	0	nd	nd	nd	nd
			0,13	nd	nd	nd	nd
			1,3	1,86	nd	1,09	1,43
			6,3	6,57	6,12	5,7	4,76

Tableau 15 Résultats NGS Colon Lung pour les autres mutations présentes dans les témoins cfDNA Horizon exprimés en fréquence allélique (%). Nd : non détecté

Les analyses ont permis de détecter également d'autres mutations ne faisant pas partie des mutations indiquées par le fournisseur. Les plus fréquentes sont retrouvées dans les 4 témoins de référence à des fréquences alléliques similaires (Tableau 16). Elles correspondent à des mutations présentes dans l'ADN génomique des cellules de la lignée parentale (162) utilisée pour diluer les mutations d'intérêt des témoins.

Gène	c.DNA	Protéine	Fréquence allélique moyenne (%)	Ecart type
BRAF	c.1799T>A	p.Val600Glu	29,31	2,47
CTNNB1	c.98C>A	p.Ser33Tyr	24,90	1,88
EGFR	c.2155G>A	p.Gly719Ser	18,85	1,30
PIK3CA	c.3140A>G	p.His1047Arg	22,47	1,96
TP53	c.376-7C>T	intronique	21,52	2,00
TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	69,29	4,16
MAP2K1	c.167A>C	p.Gln56Pro	19,62	3,07

Tableau 16 Fréquence allélique des autres mutations retrouvées

IV.2.3.2. Panel Oncomine

Après traitement des données, les résultats des analyses sont rendus sous la forme de tableurs excel obtenu à partir de l'outil d'analyse bioinformatique en ligne Ion reporter. Les manipulations ont été réalisées une seule fois. Les résultats sont résumés dans le Tableau 17 pour chacun des 4 témoins de référence.

Gene	c.DNA	Proteine	Fréquence allélique attendue	Manipulation 1
EGFR	c.2573T>G	p.Leu858Arg	0	nd
			0,1	nd
			1	1,22
			5	5,37
	c.2369C>T	p.Thr790Met	0	nd
			0,1	0,12
			1	1,70
			5	6,39
	c.2235_2249delG GAATTAAGAGAA GC	p.Glu746_Ala750de I	0	nd
			0,1	0,05
			1	1,29
			5	5,43
c.2300_2308dupC CAGCGTGG	p.Ala767_Val769du p	0	nd	
		0,1	0,18	
		1	0,94	
		5	3,96	

Tableau 17 Résultats NGS Oncomine pour les mutations d'*EGFR* exprimés en fréquence allélique (%). Nd : non détecté

La mutation d'intérêt T790M est détectée pour les témoins lorsque sa fréquence allélique est de 0,1 %, 1 % et 5 %. La mutation d'intérêt L858R n'est détectée que pour les témoins où sa fréquence allélique est de 1 % et 5 %.

Le panel NGS Oncomine nous a aussi permis d'analyser simultanément d'autres mutations sur des gènes différents. Pour les autres mutations présentes dans les témoins cfDNA Horizon et indiquées par le fournisseur, les résultats sont présentés dans le Tableau 18.

Gene	c.DNA	Proteine	Fréquence allélique attendue	Manipulation 1
KRAS	c.35G>A	p.Gly12Asp	0	nd
			0,13	nd
			1,3	1,62
			6,3	7,02
NRAS	c.181C>A	p.Gln61Lys	0	nd
			0,13	nd
			1,3	1,40
			6,3	6,88
	c.175G>A	p.Ala59Thr	0	nd
			0,13	0,24
			1,3	0,97
			6,3	6,96
PIK3CA	c.1633G>A	p.Glu545Lys	0	nd
			0,13	0,16
			1,3	1,11
			6,3	5,83

Tableau 18 Résultats NGS Oncomine pour les autres mutations présentes dans les témoins cfDNA Horizon (Fréquence allélique %). Nd : non détecté

Par ailleurs plusieurs des mutations présentes dans l'ADN génomique des cellules de la lignée parentale (162) ayant servi pour diluer les mutations d'intérêt des témoins sont détectées à des fréquences alléliques équivalentes, quels que soient les témoins DNA Horizon utilisés (Tableau 19).

Gène	c.DNA	Protéine	Fréquence allélique moyenne (%)	Ecart type
BRAF	c.1799T>A	p.Val600Glu	31,78	1,68
EGFR	c.2155G>A	p.Gly719Ser	19,79	1,12
PIK3CA	c.3140A>G	p.His1047Arg	24,375	1,30
MAP2K1	c.167A>C	p.Gln56Pro	24,07	1,23

Tableau 19 Fréquence allélique des autres mutations retrouvées

IV.2.4. Analyse par ddPCR

Cette technique étant nouvelle sur notre plateforme, nous avons réalisé des étapes de mise au point avant d'analyser nos témoins DNA Horizon.

IV.2.4.1. Limite de détection (LoD)

La limite de détection (LoD) d'une méthode est la plus basse concentration ou fréquence allélique pour un composé analysé, qui après traitement à travers toutes les étapes d'une méthode d'analyse, produit un signal détectable avec une fiabilité statistiquement différent de celui produit par un contrôle négatif dans les mêmes conditions. La LoD peut être obtenue soit expérimentalement en diluant en série des ADN comportant la mutation d'intérêt à des fréquences alléliques déterminées, soit par calcul à partir de la valeur de limite de blanc (LoB).

Cette dernière correspond au nombre moyen d'évènement ou gouttelette faux positifs éventuellement détectés dans des échantillons wild-type, c'est-à-dire ne présentant aucune mutation. En effet, en absence de contamination, des évènements faux positifs peuvent être générés par l'hydrolyse aspécifique des sondes de reconnaissance du variant cible (163).

Dans nos expérimentations, la LoB a été déterminée en analysant de manière indépendante 24 réplicats de ddPCR à partir de 20 ng de contrôle négatif ne comportant donc pas de mutation T790M d'*EGFR* (Figure 36).

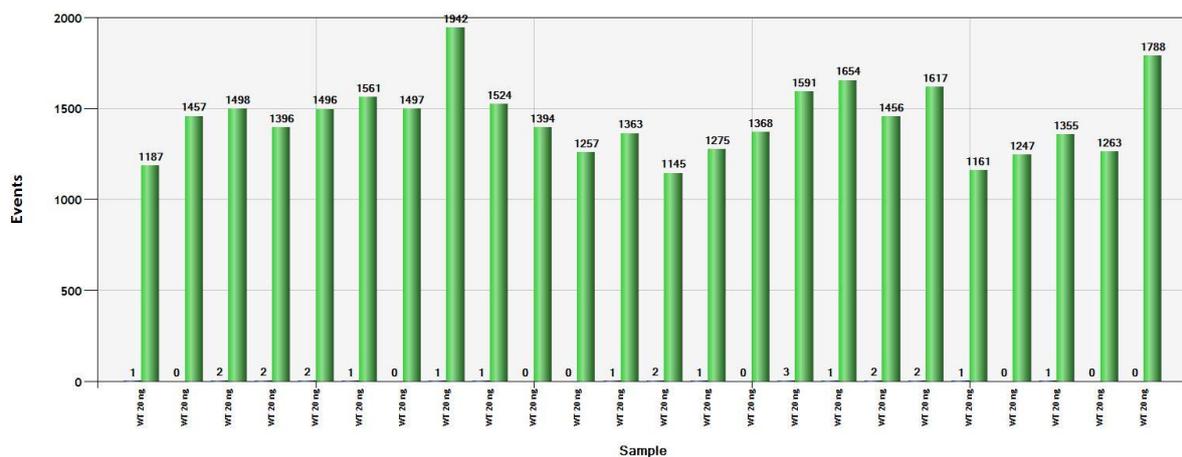


Figure 36 Résultats de l'analyse de 24 réplicats de contrôle négatif à 20 ng (Nombre d'évènement ou gouttelette sauvage en vert et muté le long de l'axe des abscisse).

Nos résultats montrent que le nombre moyen d'évènements faux positifs est égal à 1 évènement ou gouttelette en moyenne sur l'analyse de 24 réplicats. Ce chiffre correspond à

la LoB. La limite de détection (LoD) peut ensuite être déterminée en multipliant par 3 la valeur de la LOB (163). Notre LoD est donc de 3 évènements ou gouttelettes pour une quantité de 20 ng d'ADN initial.

La limite de détection expérimentale varie en fonction de la quantité d'ADN totale analysée (164). Nous avons donc testé la limite de blanc pour des quantités d'ADN analysées différentes sur des réplicats de contrôle négatif à 2,5 ng, 5 ng, 10 ng et 40ng. Le nombre moyen d'évènement faux positif était inférieur à 1 évènement ou gouttelette. La LoD que nous avons définie pour 20 ng est donc valable pour des quantités d'ADN allant de 2,5 ng à 40 ng par réaction dans nos conditions d'analyse.

IV.2.4.2. Résultats

Les résultats sont récupérés sur l'application QuantaSoft™ sous la forme de représentations en nuage de points avec en abscisse l'amplitude de la fluorescence VIC (Channel 2), émise lors de la détection de l'allèle muté T790M et en ordonnée l'amplitude de la fluorescence FAM (Channel 1) émise lors de la détection de l'allèle Sauvage, ceci pour chaque gouttelette analysée.

Même dans les gouttelettes où il n'y a pas de fragment d'ADN et donc pas d'hybridation des sondes Taqman®, il existe un faible de niveau de fluorescence correspondant au bruit de fond, pouvant engendrer des faux positifs. Il est donc nécessaire de définir des seuils de positivité pour les deux types de fluorescence.

Les seuils sont les mêmes pour tous les échantillons et ont été définis de façon à ne pas mettre en évidence de faux positif sur l'échantillon sauvage (WT). Ils vont permettre de différencier 4 populations de gouttelettes : les gouttelettes négatives pour les deux fluorochromes (noir), les gouttelettes avec allèle sauvage (VIC+, vert), les gouttelettes avec allèle muté T790M (FAM+, bleu) et les gouttelettes hétérozygotes (VIC/FAM+, orange). Les résultats ainsi que les seuils fixés pour la première manipulation sont présentés dans les Figure 37 à Figure 40.

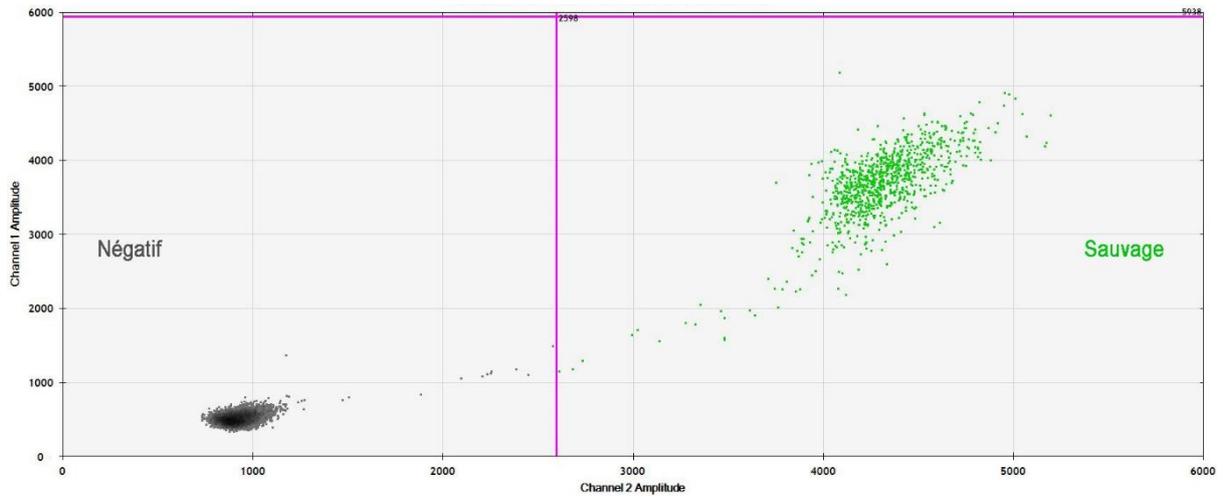


Figure 37 Résultat ddPCR pour le cfDNA sans mutation (sauvage ou WT). Seuils (violet), Gouttelette négatives pour la séquence d'intérêt (noir). Gouttelette contenant une séquence d'intérêt sauvage (vert).

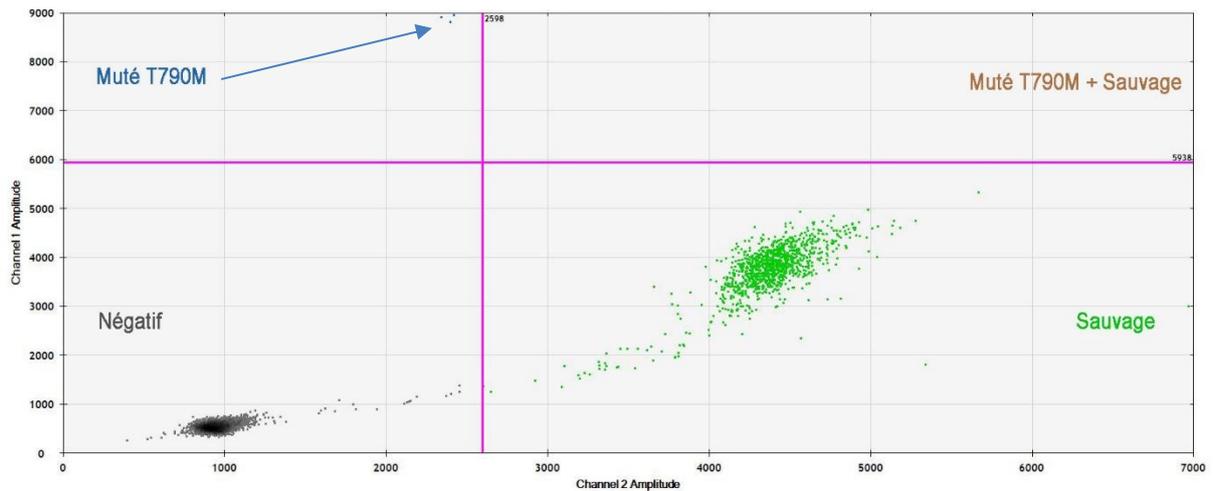


Figure 38 Résultat ddPCR cfDNA Horizon 0,1 %. Seuils (violet), Gouttelette négatives pour la séquence d'intérêt (noir). Gouttelette contenant une séquence d'intérêt sauvage (vert). Gouttelette contenant une séquence d'intérêt mutée T790M (bleu). Gouttelette contenant des séquences sauvage et muté T790M (orange).

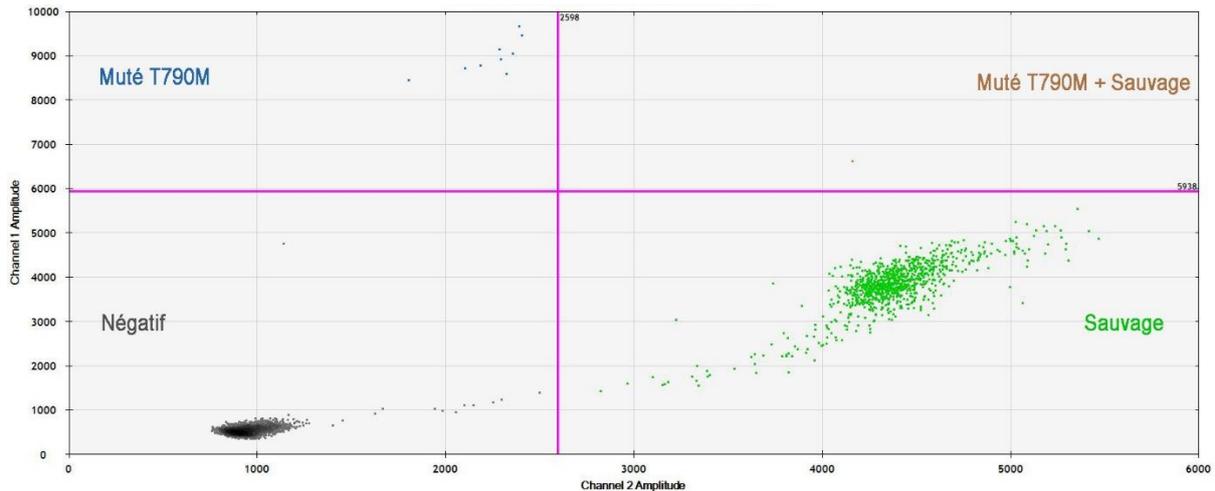


Figure 39 Résultat ddPCR cfDNA Horizon 1 %. Seuils (violet), Gouttelette négatives pour la séquence d'intérêt (noir). Gouttelette contenant une séquence d'intérêt sauvage (vert). Gouttelette contenant une séquence d'intérêt mutée T790M (bleu). Gouttelette contenant des séquences sauvage et muté T790M (orange).

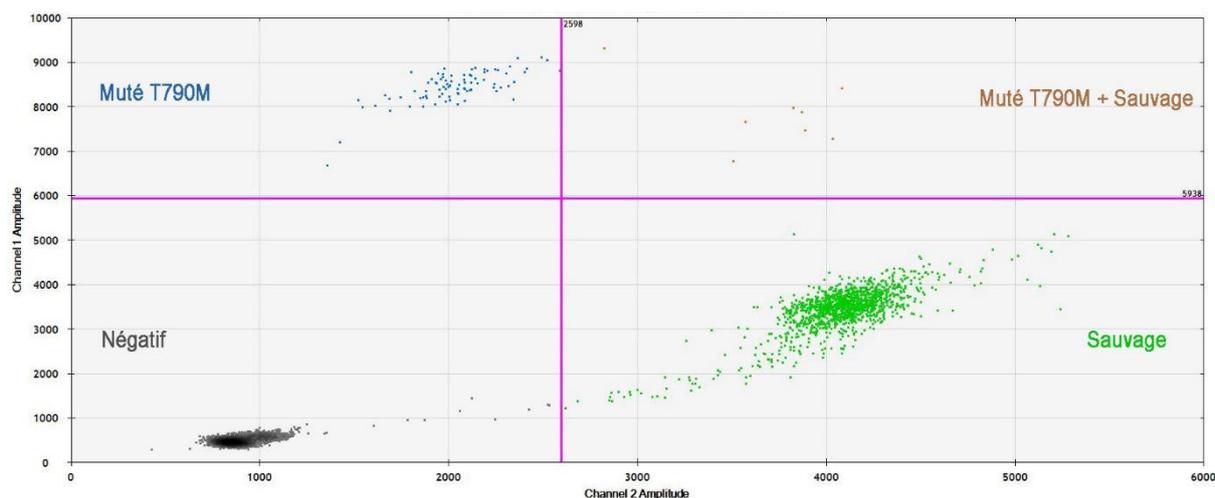


Figure 40 Résultat ddPCR cfDNA Horizon 5 %. Seuils (violet), Gouttelette négatives pour la séquence d'intérêt (noir). Gouttelette contenant une séquence d'intérêt sauvage (vert). Gouttelette contenant une séquence d'intérêt mutée T790M (bleu). Gouttelette contenant des séquences sauvage et muté T790M (orange).

Le seuil fixé pour la détection de la mutation est pertinent puisqu'il n'a pas de faux positif sur le témoin sauvage (Figure 37). L'analyse permet de détecter 3 gouttelettes « muté T790M » soit 3 évènements « muté T790M » pour le témoin à 0,1% (Figure 38). L'analyse permet de détecter 9 gouttelettes « muté T790M » et 1 gouttelette « muté T790M + sauvage » soit 10 évènements « muté T790M » pour le témoin à 1% (Figure 39). L'analyse permet de détecter 84 gouttelettes « muté T790M » et 8 gouttelettes « muté T790M + sauvage » soit 92 évènements « muté T790M » pour le témoin à 5 % (Figure 40).

L'application permet ensuite de comparer ces résultats en les affichant simultanément sous la forme d'histogrammes représentant le nombre total d'évènement (ou gouttelette) muté ou sauvage pour chaque témoin dans les deux manipulations successives (Figure 41 et Figure 42).

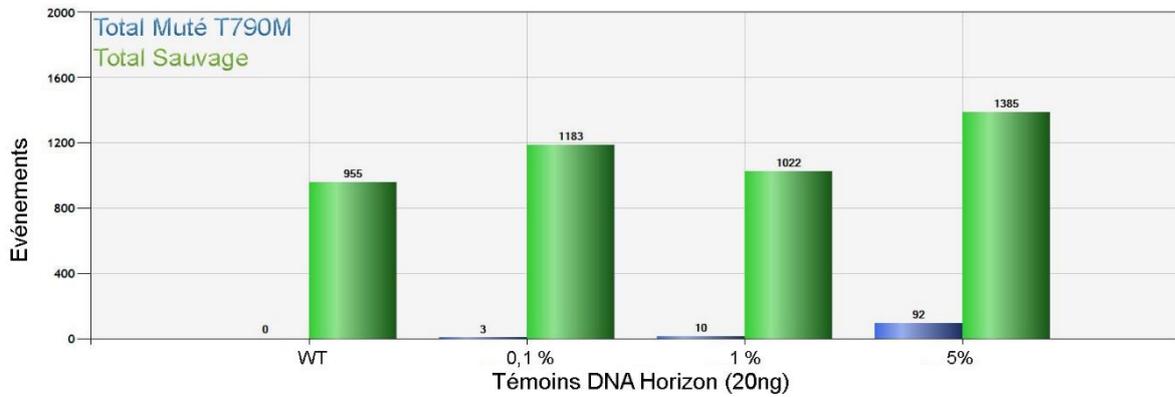


Figure 41 Résultats en nombres d'évènements Sauvage et Muté T790M par échantillons pour la manipulation 1.

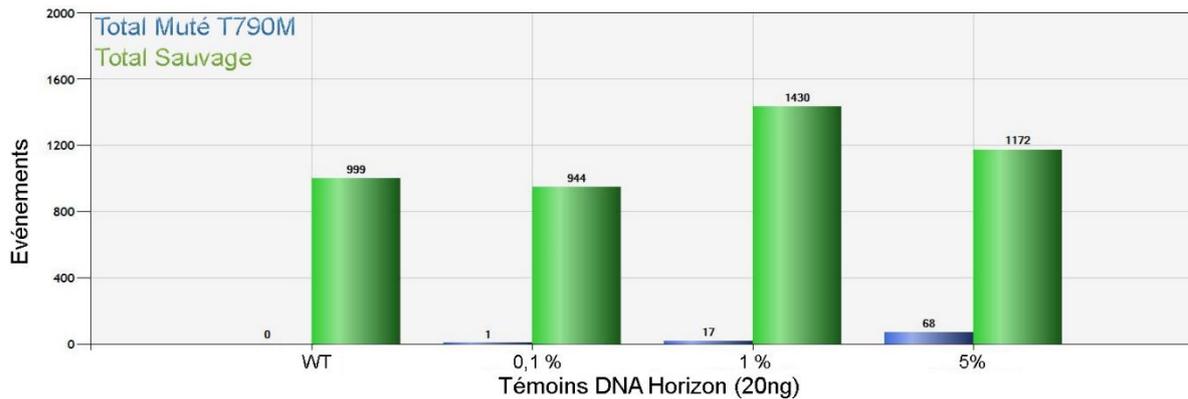


Figure 42 Résultats en nombres d'évènements Sauvage et Muté T790M par échantillons pour la manipulation 2.

Pour le témoin à 0,1 % dans la deuxième manipulation, on détecte un seul évènement ou gouttelette muté T790M. Cette valeur est inférieure à la LoD de 3 évènements que nous avons défini donc ce résultat correspond potentiellement à du bruit de fond et doit être considéré comme non significatif. Pour les autres témoins, les valeurs sont supérieures à la LoD donc la mutation est bien détectée de manière significative.

IV.2.4.3. Calcul du nombre de copies dans l'échantillon initial

La PCR digitale permet, en utilisant la loi de Poisson, de calculer le nombre de molécules (=copies) d'ADN « muté T790M » ou « sauvage » par μL présentes dans l'échantillon initial selon la formule :

Nombre de copies par gouttelette = $-\ln(1 - p)$

Où p est la fraction de gouttelettes positives sur le nombre total de gouttelettes (Figure 43) .

La multiplication du nombre de copies par gouttelette par le nombre total de gouttelettes permet d'obtenir le nombre de copies présentes dans l'échantillon initial.

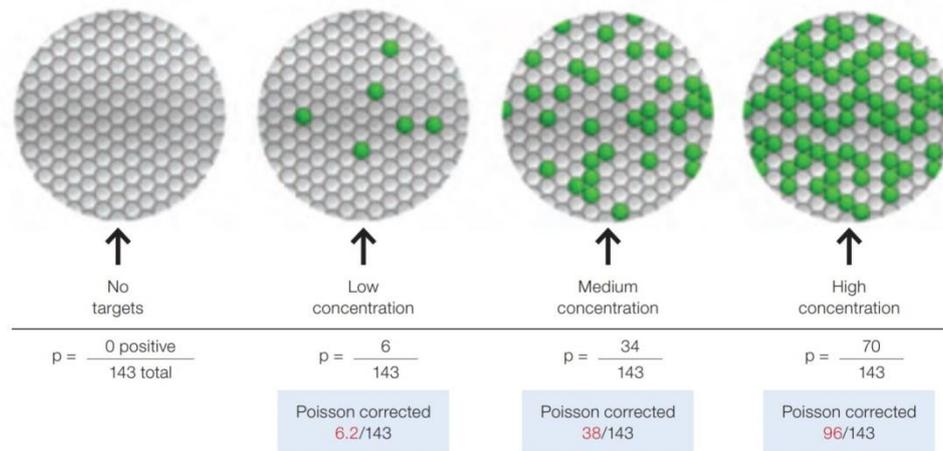


Figure 43 Estimation du nombre de copies par la loi de Poisson

Le nombre de copies par μL est obtenu en divisant le nombre de copies par le volume réactionnel, soit $20\mu\text{L}$ dans notre cas. .

Le logiciel affiche les résultats en termes de concentration avec un intervalle de confiance à 95 % matérialisé par les barres d'erreur supérieure et inférieure (Figure 44).

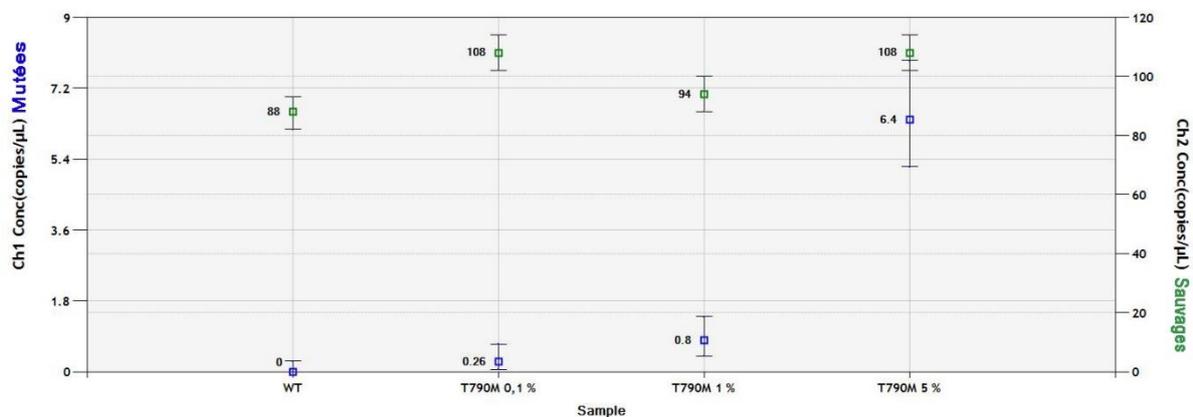


Figure 44 Résultats en nombre de copies mutées et sauvages par μL pour la manipulation 1.

Le ratio du nombre de copies « muté T790M » sur le nombre de copies total (« sauvage » + « muté T790M ») permet d'obtenir la fréquence allélique détectée. Les résultats des deux manipulations sont résumés dans le Tableau 20.

Cible analysée	Manipulation	Témoins DNA Horizon			
		WT	0,1%	1%	5 %
T790M	1	0	0,24	0,84	5,59
	2	0	0,10	0,76	3,11

Tableau 20 Fréquences alléliques détectées par ddPCR pour les 4 témoins cfDNA horizon (%)

La détection est très correcte puisque les valeurs de fréquence allélique détectées sont proches des valeurs attendues indiquées par le fournisseur. Pour le témoin à 0,1 % de la deuxième manipulation détecté à une valeur non significative, cela traduit bien un manque de quantité d'ADN pour mettre en évidence la mutation avec la LoD que nous avons défini.

IV.2.5. Comparaison de la sensibilité des techniques

Les résultats des sensibilités de toutes les techniques pour les mutations d'intérêts sont résumés pour les mutations *EGFR* L858R et *EGFR* T790M dans le Tableau 21 et le Tableau 22 respectivement.

L858R		0,1 %	1%	5%
ARMS Therascreen		0 %	100 %	100 %
qPCR COBAS		0 %	100 %	100 %
NGS	Panel Colon Lung	0%	25%	75%
	Panel Oncomine	0%	100%	100%

Tableau 21 Sensibilité des différentes techniques pour la détection de la mutation L858R.

La sensibilité des différentes techniques apparaît similaire avec une détection de la mutation L858R pour une fréquence allélique de 1% et plus. Pour les techniques de NGS, la sensibilité est inférieure avec le panel Colon Lung.

Aucune des techniques ne permet de mettre en évidence la mutation L858R à une fréquence allélique de 0,1%. Cependant nous n'avons pas évalué la ddPCR pour cette mutation d'intérêt.

T790M		0,1 %	1%	5%
ARMS Therascreen		0 %	50 %	100 %
qPCR COBAS		0 %	100 %	100 %
NGS	Panel Colon Lung	0%	25%	100%
	Panel Oncomine	100%	100%	100%
ddPCR		50%	100%	100%

Tableau 22 Sensibilité des différentes techniques pour la détection de la mutation T790M

Les sensibilités de la ddPCR et du panel Oncomine sont supérieures pour la détection de la mutation T790M à une fréquence allélique de 0,1 %. La sensibilité du panel Oncomine apparaît supérieure mais les analyses n'ont pu être réalisées qu'à une seule reprise .

Les autres techniques n'ont pas permis de mettre en évidence la mutation à cette fréquence allélique de 0,1 %.

IV.3. Etude rétrospective par ddPCR sur biopsies liquides et tissulaires chez 10 patients initialement négatifs pour la mutation T790M

IV.3.1. Données cliniques

Les principales données concernant la population de notre étude sont résumées dans le Tableau 23. La moyenne d'âge des patients dans notre étude était de 73 ans. Le sexe ratio était de 6 femmes pour 4 hommes. Tous les patients étaient d'emblée métastatiques au diagnostic. Neuf des patients présentaient des métastases à distance (osseuses, hépatiques, cérébrales ou surrénaliennes). Le dernier patient présentait des lésions pulmonaires multiples dans différents lobes associées à des métastases ganglionnaires. Ils avaient tous reçu un traitement de première ligne par ITK : afatinib (Giotrif), géfitinib (Iressa) ou erlotinib (Tarceva).

Patient	Age	Sexe	Stade	Tissu	Cellules tumorales (%)	Mutation	Traitement
1	67	F	Métastases osseuses et ganglionnaires	Biopsies pulmonaires	80	L858R	Giotrif
2	75	H	Métastases hépatiques et cérébrales	Biopsies hépatiques	80	Exon 21 (Leu861Gln)	Iressa
3	87	F	Métastases surrenaliennes	Biopsies pulmonaires	20	L858R + MET (Glu 170Asp)	Iressa
4	49	F	Métastases cérébrales, hépatiques et osseuses	Lobectomie pulmonaire	80	L858R	Iressa
5	82	H	Multiplés lésions dans différents lobes pulmonaires et métastases ganglionnaires	Biopsies bronchiques	10 à 14	L858R	Tarceva
6	78	H	Métastases hépatiques, osseuses et ganglionnaires	Biopsies hépatiques	30	L858R	Giotrif
7	74	F	Métastases hépatiques, osseuses et cérébrales	Biopsies pulmonaire	5 à 9	L858R	Giotrif puis Tarceva
8	59	F	Métastases osseuses	Biopsies osseuses	20	L858R	Iressa
9	64	H	Métastases osseuses	Biopsies pleurales	10 à 14	L858R, PIK3CA	Iressa
10	96	F	Métastases surrenaliennes et ganglionnaires	Cytologie pleurale	5 à 9	Exon 19	Tarceva

Tableau 23 Principales données cliniques, histopathologiques et biologiques des patients

Sous TKI, sept des patients ont présenté des signes objectifs de progression en imagerie (augmentation de taille des lésions existantes ou nouvelle localisation métastatique).

En deuxième ligne après récurrence, 5 de ces patients ont été traités par chimiothérapie, et 2 par osimertinib : l'un suite à la détection d'une mutation T790M dans l'ADNtc et l'autre sur décision de la patiente, hors indication et contre la décision de traitement par chimiothérapie de la réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP).

Les trois derniers patients étaient stables ou présentaient une réponse seulement partielle avec un maintien du traitement par TKI de 1^{ère} ou 2^{ème} génération.

A l'issue de notre étude, deux patients ont été perdus de vue et deux patients sont décédés. Les six autres patients bénéficient encore d'un suivi.

IV.3.2. Données histopathologiques

Les prélèvements tissulaires ayant servi pour les analyses histologiques et de biologie moléculaire ont été réalisés soit sur la tumeur primitive, soit sur des localisations

métastatiques. Au niveau de la tumeur primitive, les prélèvements étaient des biopsies pulmonaires, bronchiques, pleurales, des cytologies pleurales (Figure 45) et un prélèvement correspondait à une pièce de lobectomie pulmonaire.

Trois des prélèvements correspondaient à des localisations métastatiques : deux sur biopsies hépatiques et un sur biopsies osseuses.

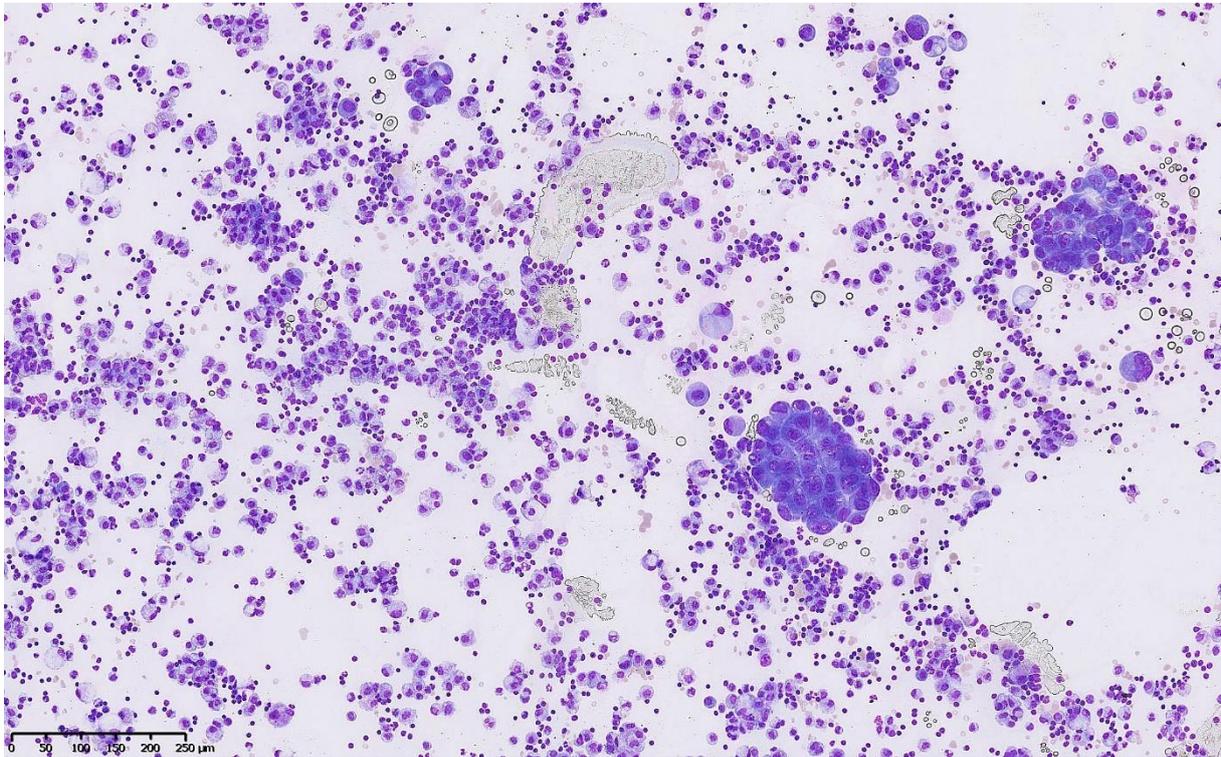


Figure 45 Cytologie pleurale d'un adénocarcinome pulmonaire, Giemsa x 100 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

Les 10 patients inclus étaient atteints d'adénocarcinome pulmonaire. Il s'agissait pour la plupart des cas de lésions moyennement à bien différenciées. Un des patients a présenté une réversion phénotypique avec transformation d'un adénocarcinome en carcinome mixte avec une composante adénocarcinomateuse de type lépidique et une composante de type carcinome à petites cellules (exprimant les marqueurs neuro-endocrines : NCAM, Chromogranine) (Figure 46).

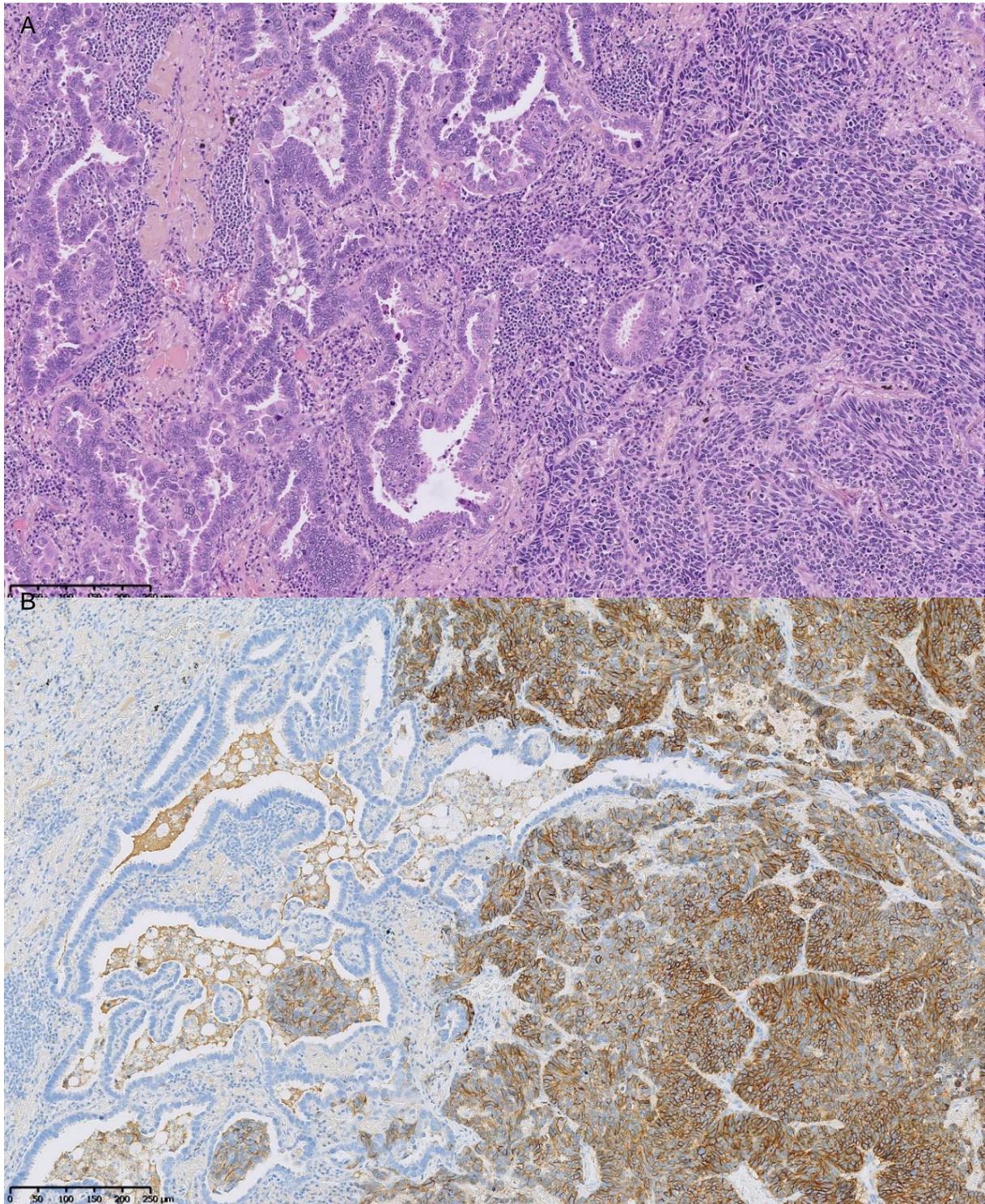


Figure 46 Carcinome mixte avec composante adénocarcinomeuse de type lépidique (à gauche) et composante de type carcinome à petites cellules (à droite). Coloration HES x 100 (A). Immunohistochimie avec anticorps anti-NCAM (B) (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

Le type histologique a été confirmé par la présence d'un muco-sécrétion à la coloration par le bleu alcian, associée à un profil immunohistochimique TTF1+ chez 9 des patients. Le dernier patient présentait un profil immunohistochimique TTF1+ malgré l'absence de muco-sécrétion.

IV.3.3. Données biologiques

Tous les patients avaient une mutation activatrice d'*EGFR* détectée dans l'ADNtc sur les analyses initiales. Il s'agissait d'une mutation L858R pour huit des patients dont 6 pour lesquels elle était retrouvée simultanément sur la biopsie tissulaire. Un patient présentait une délétion de l'exon 19, retrouvée sur la biopsie tissulaire. Le dernier patient présentait une mutation de l'Exon 21 p.Leu861Gln, retrouvée sur le plasma et la biopsie tissulaire.

Biopsies liquides :

Nous avons utilisé 2 tubes de plasma congelés pour les analyses sauf pour deux patients où nous disposions d'un seul tube après les analyses initiales. L'étape d'extraction nous a permis de récupérer des quantités variables d'ADN allant de 0,488 à 36,2 ng.

Biopsies tissulaires :

Pour l'ADN déjà extrait à partir du tissu FFPE les quantités d'ADN étaient plus importantes allant de 11,2 à 80 ng.

IV.3.4. Analyses par ddPCR

Pour être considérés comme positifs en terme de mutation détectée, les résultats devaient être supérieurs à la LoD soit supérieurs à 3 évènements ou gouttelettes par échantillon.

IV.3.4.1. Biopsies liquides

Les résultats des analyses des 10 échantillons de plasma sont regroupés dans le Tableau 24.

Patient	Quantité d'ADN analysée (ng)	Evénements	Copies mutées	Copies mutée/ul	Copies sauvages/ul	Fréquence allélique (%)	Résultat
1	1,28	0	0	0	9,3	0,00	négatif
2	32,76	1	0,896	0,0128	139,5	0,01	négatif
3	11,27	0	0	0	15,9	0,00	négatif
4	6,35	0	0	0	14,7	0,00	négatif
5	2,718	2	2,181	0,0727	24,5	0,30	négatif
6	36,2	4	4,64	0,232	343	0,07	positif
7	6,78	8	6,96	0,116	28,5	0,41	positif
8	7,7	6	4,956	0,0708	28,1	0,25	positif
9	22,96	2	2,332	0,0583	18,6	0,31	négatif
10	0,488	0	0	0	17,1	0,00	négatif

Tableau 24 Résultats de l'analyse de T790M par ddPCR sur les plasmas.

Compte-tenu de notre valeur LoD, la mutation T790M a été détectée chez 3 des 10 patients. Une mutation T790M a été détectée par qPCR Cobas chez le patient 9 sur une biopsie liquide ultérieure. Cependant sur ce prélèvement nous n'avons pas détecté un nombre d'évènement significatif.

IV.3.4.2. Biopsies tissulaires

Les résultats des analyses des 10 échantillons de tissu sont regroupés dans le Tableau 25.

Patient	Quantité d'ADN analysée (ng)	Evénements	Copies mutées	Copies mutées/ul	Copies sauvages/ul	Fréquence allélique (%)	Résultat
1	23	0	0	0	58,9	0,00	négatif
2	33	1	0,956	0,0478	136	0,04	négatif
3	11,2	0	0	0	59,7	0,00	négatif
4	71	10	8,84	0,442	1726	0,03	positif
5	11,24	0	0	0	69,6	0,00	négatif
6	80	0	0	0	460	0,00	négatif
7	15,81	0	0	0	103,4	0,00	négatif
8	80	13	15,78	0,789	784	0,10	positif
9	80	0	0	0	637	0,00	négatif
10	80	1	0,988	0,0494	449	0,01	négatif

Tableau 25 Résultats de l'analyse de T790M par ddPCR sur les biopsies tissulaires.

On détecte la mutation T790M sur les biopsies tissulaires pour le patient 4 et 8 avec notre valeur de LOD à 3 évènements. Pour le patient 8, nous détectons donc la mutation T790M sur le plasma et la biopsie tissulaire.

V. Discussion

V.1. Comparaison des performances des tubes de prélèvements EDTA et Roche

La sensibilité de détection de la mutation *EGFR* L858R par pyroséquencage, reste stable jusqu'à 3 jours avec les tubes Roche alors qu'elle décroît rapidement avec les tubes EDTA.

Les prélèvements sur tubes EDTA, stockés à température ambiante, montrent en effet une diminution de sensibilité ou une absence de détection de la mutation dès que le protocole habituel de prise en charge (le jour même (J_0) dans un délai de 3 heures) n'est pas respecté. Ainsi la mutation n'est plus détectable dans plus de la moitié des cas à J3.

Cela s'explique par le fait qu'après un délai de 8 heures, même lorsqu'on utilise des tubes avec anticoagulant, permettant de récupérer du plasma, un début de lyse des globules blancs entraîne un relargage de leur contenu en ADN génomique (121). Cet ADN génomique entraîne une dilution de la mutation somatique présente dans l'ADNtc dont la concentration devient inférieure à la limite de détection de la technique (118) (119) (121).

L'EDTA contenu dans ces tubes permet la chélation des ions calcium, ce qui empêche la coagulation du sang mais ne permet pas d'éviter durablement le phénomène de lyse cellulaire des globules blancs qui apparaît indépendant des phénomènes d'hémolyse sur ces tubes avec anticoagulant (165).

La littérature montre des résultats similaires à ceux obtenus dans notre étude, bien qu'ils reportent qu'une mutation peut être détectée jusqu'à 24 à 48h avec les tubes EDTA (166).

Les tubes Roche, stockés à température ambiante, permettent une détection de la mutation dans 75% des cas à J7. Ces résultats s'expliquent par le fait que ces tubes contiennent un conservateur cellulaire, dont la nature n'est pas mentionnée par le fabricant, qui limite le phénomène de lyse des cellules sanguines nucléées (122). Cependant le nombre élevé de copies de fragment muté que nous avons utilisé rend sans doute la détection encore possible même quand la lyse des cellules leucocytaires a débuté entre j3 et j7.

D'autres types de tubes contenant des conservateurs cellulaires existent déjà depuis plusieurs années (167), comme les tubes Streck (119) qui ont démontré une efficacité similaire aux tubes Roche sur une période de 7 jours. Cependant si la période est étendue à 14 jours, les tubes Roche montrent une efficacité supérieure sur la prévention de la libération d'ADN génomique par les leucocytes (165).

Ces tubes permettent une conservation prolongée à température ambiante qui rend possible d'envisager une analyse de tous les prélèvements régionaux d'ADN tumoral circulant sur une

plateforme de biologie moléculaire unique. C'est l'organisation que nous utilisons sur la plateforme de génétique moléculaire du cancer de Limoges où nous recevons les prélèvements régionaux des hopitaux de Brive La Gaillarde ou Guéret ainsi que ceux des cliniques de toute l'ancienne région Limousin.

D'autres paramètres influençant la longévité de conservation de l'ADNtc dans les différents tubes pourraient être étudiés. Les conditions de transport des tubes peuvent par exemple avoir un effet sur la lyse des leucocytes et la détection de la mutation d'intérêt. Une donnée de la littérature montre qu'il n'existe pas d'augmentation statistiquement significative de la quantité d'ADN génomique, et donc de la lyse des leucocytes après un transport de 47,5h avec fret aérien (168). Par contre les variations de températures inférieure à 10°C ou supérieure à 40°C, pendant de longues périodes, sont associées à la libération d'importantes quantités d'ADN génomique (119).

Enfin, le pyroséquençage que nous avons utilisé pour détecter la mutation L858R en fonction des conditions n'est pas la technique la plus sensible. Cette technique a été choisie lors de la mise à disposition des tubes Roche pour les centres extérieurs afin de tester la durée de stockage maximale que pouvaient supporter ces tubes avant d'être pris en charge par la Plateforme sans perte de sensibilité de détection. Il était alors nécessaire d'obtenir cette information rapidement même si la seule technique quantitative à ce moment-là était le pyroséquençage.

Il serait sans doute nécessaire de tester à nouveau ces conditions en utilisant la PCR digitale pour la détection de la mutation L858R avec un nombre de copies initial variable. D'autre part, les mêmes conditions seraient à tester en ce qui concerne la mutation T790M.

Quoi qu'il en soit, cette première partie de notre étude permet de montrer que les tubes Roche sont préférables aux tubes EDTA pour la recherche de mutation sur l'ADNtc lorsqu'ils sont conservés à température ambiante au delà de 24 à 48h.

V.2. Comparaison de la sensibilité et de la spécificité des méthodes d'analyses

Notre étude montre que les sensibilités de la ddPCR et du panel Oncomine en NGS sont supérieures aux autres techniques (ARMS, Cobas et Panel Colon Lung NGS). Ce sont les seules techniques permettant de mettre en évidence la mutation T790M à une fréquence allélique de 0,1 %.

Cette importante sensibilité est primordiale pour détecter précocement un faible contingent au sein de la tumeur qui exprime la mutation de résistance T790M. La mise en évidence de cette dernière a en effet un impact en terme de pronostic puisqu'elle est associée avec une progression de la maladie et la survenue de métastases avant même les signes radiologiques (169) (170). Mais aussi un impact théranostique puisque la présence de la mutation T790M est prédictive d'une réponse au TKI de 3^{ème} génération avec une augmentation de la survie sans progression, dans la mesure où la première ligne de traitement choisie est un ITK de 1^{ère} ou 2^{ème} génération (171) (172).

L'un des biais de notre étude est la sensibilité obtenue en NGS pour le Panel Oncomine Lung cfDNA Assay puisqu'elle a été évaluée sur une seule manipulation. Cette manipulation devra être reproduite mais le fait de détecter la mutation T790M sur un seul essai est justement en faveur d'une sensibilité supérieure aux autres techniques, hormis la ddPCR, qui n'ont jamais permis de mettre en évidence les mutations d'intérêts à une fréquence allélique de 0,1%.

Cependant le coût important du panel Oncomine Lung cfDNA Assay (173) et la durée de manipulation de 2 jours, en comptant la nouvelle étape de purification nécessaire, représentent des freins importants à son utilisation en routine de laboratoire.

De plus celui-ci ne peut pas être séquencé simultanément sur la même puce NGS avec un autre panel tel que le panel Ion AmpliSeq™ Colon and Lung Cancer v.2 utilisé actuellement en routine pour les prélèvements tissulaires. Hors pour être rentable, étant donné le prix important d'une puce NGS Ion PI™ (174), il est nécessaire soit d'avoir un volume d'échantillon hebdomadaire important à analyser, ce qui n'est pas forcément le cas pour les plateformes de petite à moyenne taille. Soit d'attendre d'avoir un nombre important d'échantillon à analyser, ce qui n'est pas compatible avec la recherche des mutations d'*EGFR* dans le cancer du poumon qui en cas de positivité modifie la prise en charge à court terme.

La ddPCR émerge donc comme la technique de choix puisqu'elle cumule à la fois une sensibilité de détection jusqu'à 0,1 % de fréquence allélique pour la mutation T790M et une rapidité de rendu des résultats avec une faible durée de manipulation d'environ 4h après extraction de l'ADNtc.

V.3. Etude rétrospective par ddPCR sur biopsies liquides et tissulaires initialement négatives pour la mutation T790M chez 10 patients.

La présence d'une mutation T790M en situation de rechute sous ITK 1^{ère} et 2^{ème} génération est une indication à l'instauration d'un traitement par osimertinib avec une augmentation de la survie sans récurrence par rapport à la chimiothérapie par sel de platine et pemetrexed (175). L'étude rétrospective des biopsies liquides et tissulaires de 10 patients nous a permis de reclasser 4 patients comme positifs pour la mutation T790M, 2 sur la biopsie liquide, 1 sur la biopsie tissulaire et 1 sur les 2 prélèvements. Cette constatation montre l'intérêt de la sensibilité supérieure de la ddPCR par rapport aux techniques utilisées pour les analyses initiales (qPCR Cobas et ARMS Therascreen), puisqu'elle rend ces 4 patients éligibles à un traitement par ITK de 3^{ème} génération (osimertinib). Ces résultats présentent une amélioration de la fréquence de détection d'environ 25% après récurrence par les techniques utilisées jusque là. La mutation T790M serait donc mise en évidence dans environ 40% des cas ayant récidivé sous ITK se rapprochant ainsi de la valeur de 50% théorique reportée dans la littérature (61) (62), sans toutefois l'atteindre. Cette différence peut être due au petit nombre d'échantillons testés, à un manque de sensibilité de nos analyses ou à un biais de sélection de notre population.

La sensibilité de nos analyses a en effet été limitée par plusieurs facteurs.

Tout d'abord, à l'exception de deux échantillons, la quantité d'ADNtc obtenu lors de l'extraction n'a pas permis d'analyser les 20ng requis pour certifier que l'absence d'événements observée lors de la ddPCR ne correspondait pas à des faux négatifs. Etant donné que la limite de détection dépend de la quantité d'ADN apportée (164), nous n'avons potentiellement pas détecté des mutations de faibles fréquences alléliques dans le sang. Afin de pallier à cet inconvénient pour les futures analyses, la plateforme a adapté son protocole d'extraction qui s'effectue désormais sur 2 tubes Roche contenant 8 mL de sang afin d'augmenter la quantité d'ADNtc initial.

L'autre facteur important a été la qualité de l'ADN. Certains des prélèvements, en particulier ceux datant de 2017, ont été conservés sur de longue durée en congélation avant extraction avec une altération de la qualité de l'ADN. Elle se traduit sur les analyses par une disposition en « spray » des gouttelettes sur un axe diagonal (Figure 47), qui nous a contraint à augmenter le niveau de seuil de détection de la fluorescence pour la sonde T790M/FAM.

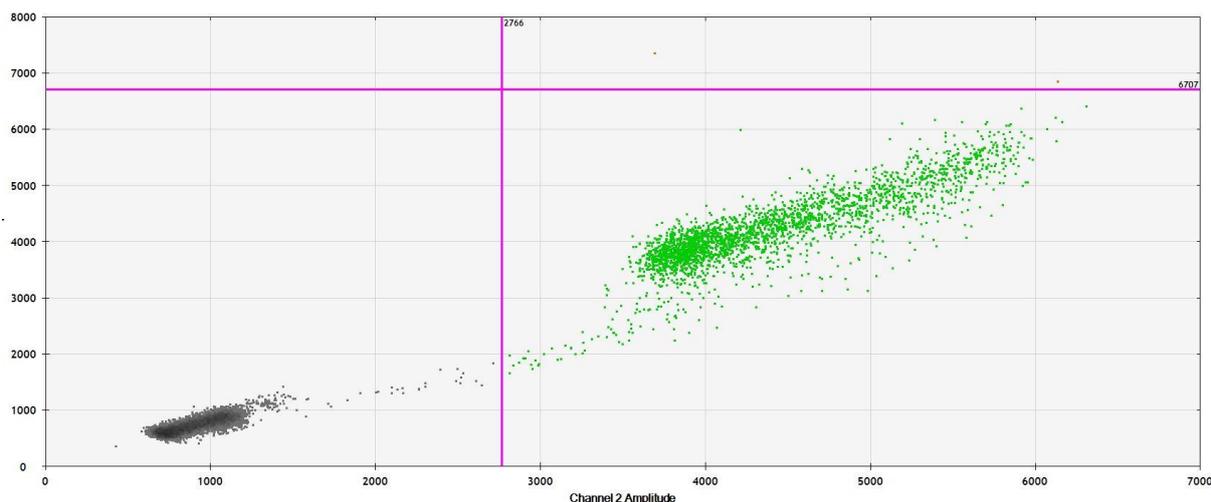


Figure 47 Artefacts secondaires à la mauvaise qualité d'un échantillon

Ensuite, la limite de sensibilité de la ddPCR que nous avons obtenu en testant nos témoins mutés T790M est plus faible que la sensibilité maximale théorique reportée par le fournisseur Biorad puisque, avec notre LoD, nous ne détectons pas la mutation de manière reproductible à la fréquence allélique de 0,1% pour la quantité d'ADN de 20ng que nous analysée (Figure 48).

	Amount of Amplifiable DNA Analyzed per Assay, ng	QuantaSoft™ Software Readout, copies/μl	Haploid Genome Equivalents*	Maximum Sensitivity**
	400	6,060.6	121,212.1	0.002%
Maximum allowable DNA per well	350	5,303.0	106,060.6	0.003%
	300	4,545.5	90,909.1	0.003%
	250	3,787.9	75,757.6	0.004%
	200	3,030.3	60,606.1	0.005%
	150	2,272.7	45,454.5	0.007%
	100	1,515.2	30,303.0	0.010%
	75	1,136.4	22,727.3	0.013%
	50	757.6	15,151.5	0.020%
	40	606.1	12,121.2	0.025%
	33	500.0	10,000.0	0.030%
	25	378.8	7,575.8	0.040%
	20	303.0	6,060.6	0.050%
	15	227.3	4,545.5	0.066%
	10	151.5	3,030.3	0.099%
	5	75.8	1,515.2	0.198%
Very low DNA input	1	15.2	303.0	0.99%
	0.5	7.6	151.5	1.98%
	0.1	1.5	30.3	9.90%
Minimum copies	0.01	0.2	3.0	99.00%

* Assuming 3.3 pg DNA/haploid genome.

** Assuming no false positives and perfect controls.

Figure 48 Sensibilité maximale théorique de la ddPCR Biorad en fréquence allélique de la ddPCR en fonction de la quantité d'ADN (176)

Cette LOD théorique ne prend pas en compte les sources d'erreurs extérieures. En particulier la formation de bulles d'air lors des différentes étapes de pipetage lors de la manipulation, est un facteur opérateur dépendant qui peut entraîner une diminution du nombre de gouttelette et une mauvaise qualité des données. Le fournisseur Biorad propose ainsi un automate (QX200™ AutoDG™ Droplet Digital™ PCR System) capable de réaliser ces étapes de manière automatisée.

Un possible biais de sélection de notre population est du au fait que deux des patients n'avaient pas de signe objectif ou seulement des signes partiels de récurrence. Hors l'apparition d'une mutation T790M est corrélée avec la présence de signes de progression en particulier sur un site lésionnel déjà présent (177) (178).

Perspectives

L'AMM récente de l'Osimertinib (ITK de 3^{ème} génération) en 1^{ère} ligne dans les CBNPC localement avancé ou métastatique avec mutation activatrice de l'*EGFR* quelque soit le statut T790M (64), avec une efficacité supérieure au ITK de 1^{ère} génération géfitinib et erlotinib (179) modifie la problématique de la détection. Quoi qu'il en soit, il est primordial de pouvoir détecter avec le plus de sensibilité possible toutes les mutations de l'*EGFR* que ce soit sur tissu ou ADN tumoral circulant, pour le diagnostic initial, où les biopsies liquides peuvent fournir des informations non négligeables en cas de non-contributivité ou d'impossibilité de prélever le tissu.

Comme nos résultats le montrent la ddPCR est d'un grand intérêt en terme de sensibilité mais permet pour l'instant de rechercher seulement deux cibles simultanément avec l'appareil QX100™ Droplet Reader (Bio-Rad). Des manipulations complexes nécessitant des concentrations d'amorces variables ou des fluorophores non calibrés permettent d'augmenter le nombre de cibles mais sont inadaptées pour la recherche d'évènements rares (180).

La ddPCR peut donc être adaptée pour répondre à une question isolée, par exemple rechercher les mutations les plus courantes de l'*EGFR*.

En cas de multiplicité de cibles, il serait envisageable de réaliser les analyses par technique NGS comme avec le panel Oncomine testé dans ce projet. En effet ce panel permet de mettre en évidence toutes les mutations d'*EGFR* et d'autres gènes. L'excellente sensibilité du panel que nous avons retrouvé (avec la mise en évidence de 3 des 4 mutations de l'*EGFR* présentes dans les témoins Horizon à une fréquence allélique de 0,1 %), nous encourage donc à conduire de nouvelles études pour évaluer la reproductibilité de nos résultats. Si cette solution reste plus coûteuse, de nombreux fournisseurs, ayant bien compris l'enjeu de cette recherche,

proposent actuellement des panels de gènes pour ce faire, que ce soit par technique d'amplicon ou de capture, à des coûts de plus en plus compétitifs.

Bien que l'osimertinib ait fait la preuve de sa supériorité par rapport aux ITK de 1^{ère} et 2^{ème} génération et soit indiqué en première ligne dans les CBNPC, en deuxième ligne sa prescription requiert toujours la mise en évidence d'une mutation T790M. Sa détection reste ainsi encore un point clé pour définir la prise en charge des patients puisque beaucoup ont encore un traitement par ITK de 1^{ère} et 2^{ème} génération.

L'apparition de nouvelles mutations de résistance sous TKI de 3^{ème} génération, en particulier la mutation C797S complexifie encore la problématique. En effet bien que des études associant ITK et anti-EGFR soient en cours (181), l'absence d'alternative thérapeutique validée (181) lorsque cette mutation est retrouvée en *cis* incite les équipes à continuer d'utiliser le schéma séquentiel TKI de 1^{ère} 2^{ème} génération puis TKI de 3^{ème} génération à l'apparition d'une mutation T790M.

La mutation C797S représente une nouvelle mutation à identifier. Elle est à rechercher dans les cas de résistance à l'osimertinib de manière itérative et simultanément avec la T790M puisqu'en son absence on peut envisager un traitement par ITK de 1^{ère} et 2^{ème} génération (Figure 49).

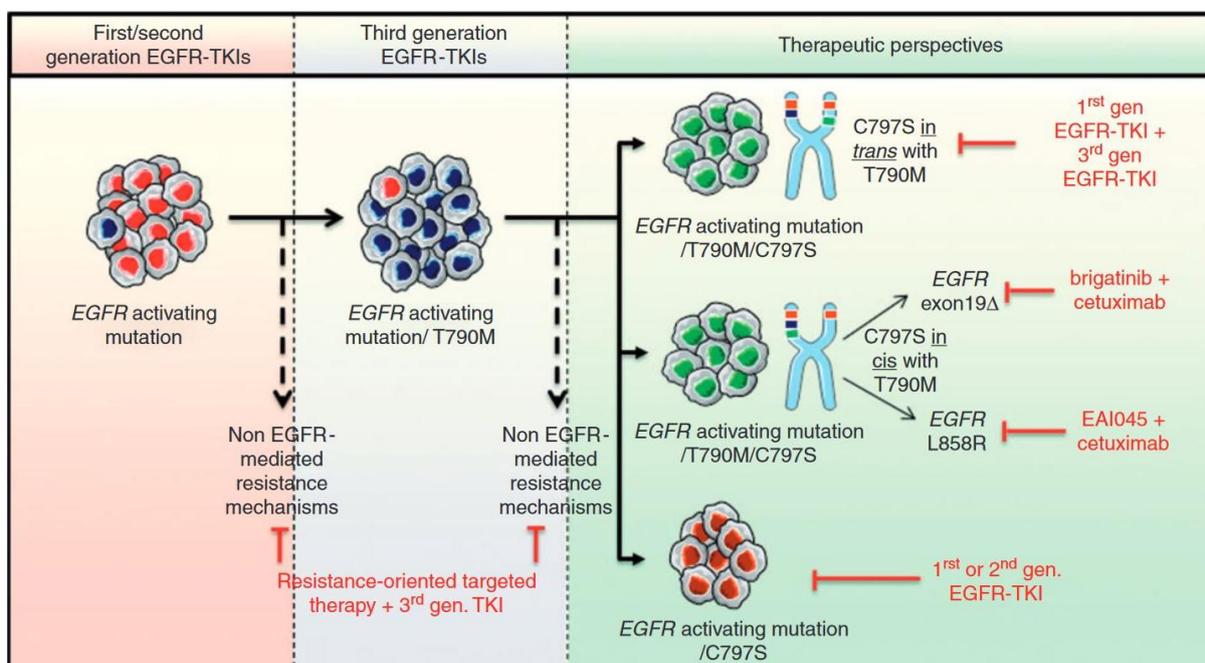


Figure 49 Perspectives thérapeutiques dans les tumeurs résistantes au ITK de 3^{ème} génération (181).

La possibilité de détection de la mutation en *cis* ou en *trans* requiert des techniques qui permettent de détecter sa position par rapport à la T790M. Puisque ces deux mutations sont séparées par 21 pb, seule une technique comme le NGS, qui reporte des séquences de fragments assez longs pour comporter les deux cibles ou des techniques utilisant plusieurs sondes dont une couvrant les deux codons sont adaptées. Cette mutation fait déjà partie des cibles de panels NGS comme le panel Oncomine (182). La PCR digitale avec des kits adaptés permet aussi de rechercher simultanément les mutations T790M et C797S, en distinguant leur caractère *cis* ou *trans*. Leur test fera l'objet d'une prochaine étude sur la PGMC de Limoges. Ainsi la PCR digitale, avec sa faible durée de manipulation, se présente comme la technique la plus adaptée pour rendre des résultats aux cliniciens dans les meilleurs délais.

La prise en charge au niveau de la PGMC s'oriente donc vers une analyse initiale par un panel NGS ciblé sur toutes les mutations de l'*EGFR*, qui présente en plus l'avantage de détecter tous les autres marqueurs d'intérêt en première intention de traiter, puis vers des biopsies liquides itératives en cas de résistance pour rechercher les mutations T790M et C797S par PCR digitale. Ainsi ces deux techniques auront leur place dans le schéma diagnostique pour permettre de proposer de façon la plus précoce un traitement personnalisé à chaque patient.

Conclusion

Dans cette étude portant sur les mutations d'*EGFR* et leur étude sur l'ADN tumoral circulant, nous avons dans un premier temps démontré la supériorité des tubes cfDNA Roche par rapport aux tubes EDTA classiquement utilisés pour la conservation des échantillons sanguins lors de la phase préanalytique. Ensuite nous avons démontré la supériorité des techniques d'analyse par PCR digitale et NGS avec panel ciblé sur le poumon (Oncomine) en termes de sensibilité pour la mutation T790M d'*EGFR*. Enfin nous avons montré que l'utilisation de la technique plus sensible qu'est la ddPCR, nous permettait de détecter la présence de cette mutation chez 4 patients sur les biopsies liquides et tissulaires où elle n'avait pas été détectée initialement par nos techniques de routine antérieures. Cette dernière constatation apporte un élément de réponse vis-à-vis de la faible fréquence de détection de la mutation T790M d'*EGFR*, dans les cas de progression sous ITK, observée avec les techniques utilisées jusqu'à présent.

Références bibliographiques

1. Colonna M. Epidémiologie du cancer du poumon en France : incidence, mortalité et survie (tendance et situation actuelle). *Rev Mal Respir Actual*. 1 sept 2016;8(5):308-18.
2. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *J Thorac Oncol*. sept 2015;10(9):1243-60.
3. Chansky K, Detterbeck FC, Nicholson AG, Rusch VW, Vallières E, Groome P, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: External Validation of the Revision of the TNM Stage Groupings in the Eighth Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 1 juill 2017;12(7):1109-21.
4. Kay FU, Kandathil A, Batra K, Saboo SS, Abbara S, Rajiah P. Revisions to the Tumor, Node, Metastasis staging of lung cancer (8th edition): Rationale, radiologic findings and clinical implications. *World J Radiol*. 28 juin 2017;9(6):269-79.
5. Hashemi-Sadraei N, Hanna N. Targeting FGFR in Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *Target Oncol*. 2017;12(6):741-55.
6. Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ, Wu Y-L, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet Lond Engl*. 21 2017;389(10066):299-311.
7. Dogan S, Shen R, Ang DC, Johnson ML, D'Angelo SP, Paik PK, et al. Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 nov 2012;18(22):6169-77.
8. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2 août 2007;448(7153):561-6.
9. Lantuejoul S, Mescam-Mancini L, McLeer-Florin A. Réarrangements du gène ALK dans les cancers du poumon non à petites cellules. 2012;4.
10. Takahashi T, Sonobe M, Kobayashi M, Yoshizawa A, Menju T, Nakayama E, et al. Clinicopathologic features of non-small-cell lung cancer with EML4-ALK fusion gene. *Ann Surg Oncol*. mars 2010;17(3):889-97.
11. Shaw AT, Solomon B, Kenudson MM. Crizotinib and testing for ALK. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN*. déc 2011;9(12):1335-41.
12. Marie-Pierrette C. Recommandations pour le testing ALK dans les CBNPC. 2017;3.
13. Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell*. 14 déc 2007;131(6):1190-203.
14. reco-ros1_sfp-afaqap_aout_2018_0.pdf [Internet]. [cité 23 févr 2019]. Disponible sur: https://www.afaqap.fr/sites/default/files/reco-ros1_sfp-afaqap_aout_2018_0.pdf

15. Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, Chmielecki J, Lu X, Bauer TM, et al. Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov.* août 2015;5(8):850-9.
16. Kong-Beltran M, Seshagiri S, Zha J, Zhu W, Bhawe K, Mendoza N, et al. Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer. *Cancer Res.* 1 janv 2006;66(1):283-9.
17. Noonan SA, Berry L, Lu X, Gao D, Barón AE, Chesnut P, et al. Identifying the Appropriate FISH Criteria for Defining MET Copy Number-Driven Lung Adenocarcinoma through Oncogene Overlap Analysis. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 2016;11(8):1293-304.
18. Kawakami H, Okamoto I, Okamoto W, Tanizaki J, Nakagawa K, Nishio K. Targeting MET Amplification as a New Oncogenic Driver. *Cancers.* 22 juill 2014;6(3):1540-52.
19. Drilon A, Cappuzzo F, Ou S-HI, Camidge DR. Targeting MET in Lung Cancer: Will Expectations Finally Be MET? *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* janv 2017;12(1):15-26.
20. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2 mars 2005;97(5):339-46.
21. Barlesi F, Mazieres J, Merlio J-P, Debieuvre D, Mosser J, Lena H, 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 Lond Engl.* 2 avr 2016;387(10026):1415-26.
22. Yatabe Y, Kosaka T, Takahashi T, Mitsudomi T. EGFR mutation is specific for terminal respiratory unit type adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol.* mai 2005;29(5):633-9.
23. Greulich H, Kaplan B, Mertins P, Chen T-H, Tanaka KE, Yun C-H, et al. Functional analysis of receptor tyrosine kinase mutations in lung cancer identifies oncogenic extracellular domain mutations of ERBB2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4 sept 2012;109(36):14476-81.
24. Lai W-CV, Lebas L, Milia J, Barnes TA, Gautschi O, Peters S, et al. Afatinib in patients with metastatic HER2-mutant lung cancers: An international multicenter study. *J Clin Oncol.* 20 mai 2017;35(15_suppl):9071-9071.
25. Imielinski M, Berger AH, Hammerman PS, Hernandez B, Pugh TJ, Hodis E, et al. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell.* 14 sept 2012;150(6):1107-20.
26. Mao C, Qiu L-X, Liao R-Y, Du F-B, Ding H, Yang W-C, et al. KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. *Lung Cancer Amst Neth.* sept 2010;69(3):272-8.
27. Jänne PA, Shaw AT, Pereira JR, Jeannin G, Vansteenkiste J, Barrios C, et al. Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol.* janv 2013;14(1):38-47.
28. Oral MEK1/MEK2 inhibitor trametinib (GSK1120212) in combination with docetaxel in KRAS-mutant and wild-type (WT) advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): A

phase I/Ib trial.: *Journal of Clinical Oncology*: Vol 31, No 15_suppl [Internet]. [cité 26 janv 2019]. Disponible sur: http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2013.31.15_suppl.8028

29. Langer CJ. Roles of EGFR and KRAS Mutations in the Treatment Of Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer. *Pharm Ther.* mai 2011;36(5):263-79.
30. Jazieh A-R, Al Sudairy R, Abu-Shraie N, Al Suwairi W, Ferwana M, Murad MH. Erlotinib in wild type epidermal growth factor receptor non-small cell lung cancer: A systematic review. *Ann Thorac Med.* 2013;8(4):204-8.
31. Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res.* 1 déc 2002;62(23):6997-7000.
32. Cardarella S, Ogino A, Nishino M, Butaney M, Shen J, Lydon C, et al. Clinical, pathologic, and biologic features associated with BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 août 2013;19(16):4532-40.
33. Hyman DM, Puzanov I, Subbiah V, Faris JE, Chau I, Blay J-Y, et al. Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations. *N Engl J Med.* 20 août 2015;373(8):726-36.
34. Planchard D, Kim TM, Mazieres J, Quoix E, Riely G, Barlesi F, et al. Dabrafenib in BRAF V600E–Mutant Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: an Open-label, Single arm, Multicenter, Phase 2 Trial. *Lancet Oncol.* mai 2016;17(5):642-50.
35. Song Z, Yu X, Zhang Y. Mutation and prognostic analyses of PIK3CA in patients with completely resected lung adenocarcinoma. *Cancer Med.* 23 août 2016;5(10):2694-700.
36. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, et al. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol [Internet].* 2017 [cité 20 janv 2019];8. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5572324/>
37. Godwin JL, Zibelman M, Plimack ER, Geynisman DM. Immune Checkpoint Blockade as a Novel Immunotherapeutic Strategy for Renal Cell Carcinoma: A Review of Clinical Trials. *Discov Med.* 19 déc 2014;18(101):341-50.
38. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science.* 3 avr 2015;348(6230):69-74.
39. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 10 nov 2016;375(19):1823-33.
40. Gandara DR, von Pawel J, Mazieres J, Sullivan R, Helland Å, Han J-Y, et al. Atezolizumab Treatment Beyond Progression in Advanced NSCLC: Results From the Randomized, Phase III OAK Study. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* déc 2018;13(12):1906-18.
41. Haute Autorité de Santé - KEYTRUDA (pembrolizumab), anticorps anti-PD1 - CBNPC 1ère ligne [Internet]. [cité 23 févr 2019]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2774645/fr/keytruda-pembrolizumab-anticorps-anti-pd1-cbnpc-1ere-ligne

42. Meeting Library | Pembrolizumab (pembro) versus platinum-based chemotherapy (chemo) as first-line therapy for advanced/metastatic NSCLC with a PD-L1 tumor proportion score (TPS) \geq 1%: Open-label, phase 3 KEYNOTE-042 study. [Internet]. [cité 23 févr 2019]. Disponible sur: <https://meetinglibrary.asco.org/record/165950/abstract>
43. PDQ Adult Treatment Editorial Board. Non-Small Cell Lung Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002 [cité 3 oct 2018]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/>
44. InfoCancer - ARCAGY - GINECO – Traitements du cancer – Traitements locaux et locorégionaux – La radiothérapie - Comment agit la radiothérapie ? [Internet]. [cité 24 févr 2019]. Disponible sur: <http://www.arcagy.org/infocancer/traitement-du-cancer/traitements-locoregionaux/radiotherapie/comment-agit-la-radiotherapie.html/>
45. VIDAL - Cancer du poumon - Prise en charge [Internet]. [cité 20 mars 2019]. Disponible sur: https://www.vidal.fr/recommandations/4025/cancer_du_poumon/prise_en_charge/#d5481e633
46. European Medicines Agency [Internet]. European Medicines Agency. [cité 20 mars 2019]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en>
47. PDQ Adult Treatment Editorial Board. Small Cell Lung Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002 [cité 23 oct 2018]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65909/>
48. Small Cell Lung Cancer Treatment [Internet]. National Cancer Institute. 1980 [cité 22 oct 2018]. Disponible sur: <https://www.cancer.gov/types/lung/hp/small-cell-lung-treatment-pdq>
49. Ferguson KM. A structure-based view of Epidermal Growth Factor Receptor regulation. *Annu Rev Biophys.* 2008;37:353-73.
50. Morrison DK. MAP Kinase Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. nov 2012 [cité 15 mai 2018];4(11). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3536342/>
51. Cortot AB. Les inhibiteurs d'EGFR dans le cancer bronchique non à petites cellules : plus qu'hier et moins que demain. *Rev Pneumol Clin.* 1 déc 2010;66(6):367-74.
52. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 20 mai 2004;350(21):2129-39.
53. Yasuda H, Park E, Yun C-H, Sng NJ, Lucena-Araujo AR, Yeo W-L, et al. Structural, biochemical and clinical characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer. *Sci Transl Med.* 18 déc 2013;5(216):216ra177.
54. Wang X, Goldstein D, Crowe PJ, Yang J-L. Next-generation EGFR/HER tyrosine kinase inhibitors for the treatment of patients with non-small-cell lung cancer harboring *EGFR* mutations: a review of the evidence [Internet]. *OncoTargets and Therapy.* 2016 [cité 25 févr 2019]. Disponible sur: <https://www.dovepress.com/next->

generation-egfrher-tyrosine-kinase-inhibitors-for-the-treatment-o-peer-reviewed-fulltext-article-OTT

55. Hanna N, Johnson D, Temin S, Masters G. Systemic Therapy for Stage IV Non–Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update Summary. *J Oncol Pract*. déc 2017;13(12):832-7.
56. Grünwald V, Hidalgo M. Development of the epidermal growth factor receptor inhibitor OSI-774. *Semin Oncol*. juin 2003;30(3 Suppl 6):23-31.
57. Sgambato A, Casaluce F, Maione P, Rossi A, Ciardiello F, Gridelli C. Cetuximab in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): the showdown? *J Thorac Dis*. juin 2014;6(6):578-80.
58. Kim ES, Neubauer M, Cohn A, Schwartzberg L, Garbo L, Caton J, et al. Docetaxel or pemetrexed with or without cetuximab in recurrent or progressive non-small-cell lung cancer after platinum-based therapy: a phase 3, open-label, randomised trial. *Lancet Oncol*. déc 2013;14(13):1326-36.
59. EGFR in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) - My Cancer Genome [Internet]. [cité 25 févr 2019]. Disponible sur: <https://www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/egfr/>
60. Stinchcombe TE. Targeted Therapies for Lung Cancer. *Cancer Treat Res*. 2016;170:165-82.
61. Sullivan I, Planchard D. Osimertinib in the treatment of patients with epidermal growth factor receptor T790M mutation-positive metastatic non-small cell lung cancer: clinical trial evidence and experience. *Ther Adv Respir Dis*. déc 2016;10(6):549-65.
62. Rosell R, Bivona TG, Karachaliou N. Genetics and biomarkers in personalisation of lung cancer treatment. *Lancet Lond Engl*. 24 août 2013;382(9893):720-31.
63. Wang S, Tsui ST, Liu C, Song Y, Liu D. EGFR C797S mutation mediates resistance to third-generation inhibitors in T790M-positive non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol* [Internet]. 22 juill 2016 [cité 20 janv 2019];9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4957905/>
64. Ramalingam SS, Yang JC-H, Lee CK, Kurata T, Kim D-W, John T, et al. Osimertinib As First-Line Treatment of EGFR Mutation-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 mars 2018;36(9):841-9.
65. Jänne PA, Yang JC-H, Kim D-W, Planchard D, Ohe Y, Ramalingam SS, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 30 avr 2015;372(18):1689-99.
66. Nie K, Zhang Z, Zhang C, Lan K, Ji Y. Effect of EGFR C797S/G mutation on osimertinib resistance in Chinese patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 20 mai 2018;36(15_suppl):e21171-e21171.
67. Zhou W, Ercan D, Chen L, Yun C, Li D, Capelletti M, et al. Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M. *Nature*. 24 déc 2009;462(7276):1070-4.

68. Solca F, Dahl G, Zoephel A, Bader G, Sanderson M, Klein C, et al. Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker. *J Pharmacol Exp Ther.* nov 2012;343(2):342-50.
69. Niederst MJ, Hu H, Mulvey HE, Lockerman EL, Garcia AR, Piotrowska Z, et al. The allelic context of the C797S mutation acquired upon treatment with third generation EGFR inhibitors impacts sensitivity to subsequent treatment strategies. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 sept 2015;21(17):3924-33.
70. Yang Z, Yang N, Ou Q, Xiang Y, Jiang T, Wu X, et al. Investigating Novel Resistance Mechanisms to Third-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Osimertinib in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 juill 2018;24(13):3097-107.
71. Yu H, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, et al. Analysis of Mechanisms of Acquired Resistance to EGFR TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant Lung Cancers. *Clin Cancer Res.* 7 mars 2013;clincanres.2246.2012.
72. Thress KS, Paweletz CP, Felip E, Cho BC, Stetson D, Dougherty B, et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med.* juin 2015;21(6):560-2.
73. Planchard D, Loriot Y, André F, Gobert A, Auger N, Lacroix L, et al. EGFR-independent mechanisms of acquired resistance to AZD9291 in EGFR T790M-positive NSCLC patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* oct 2015;26(10):2073-8.
74. Takezawa K, Pirazzoli V, Arcila ME, Nebhan CA, Song X, de Stanchina E, et al. HER2 amplification: a potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancers that lack the second-site EGFR T790M mutation. *Cancer Discov.* oct 2012;2(10):922-33.
75. Peters S, Curioni-Fontecedro A, Nechushtan H, Shih J-Y, Liao W-Y, Gautschi O, et al. Activity of Afatinib in Heavily Pretreated Patients With ERBB2 Mutation-Positive Advanced NSCLC: Findings From a Global Named Patient Use Program. *J Thorac Oncol.* 1 déc 2018;13(12):1897-905.
76. van Veggel B, de Langen AJ, Hashemi S, Monkhorst K, Rosenberg EH, Heideman DAM, et al. Crizotinib treatment for patients with EGFR mutation positive NSCLC that acquire cMET amplification after EGFR TKI therapy results in short-lived and heterogeneous responses. *Lung Cancer.* 1 oct 2018;124:130-4.
77. Del Re M, Tiseo M, Bordi P, D'Incecco A, Camerini A, Petrini I, et al. Contribution of KRAS mutations and c.2369C > T (p.T790M) EGFR to acquired resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant NSCLC: a study on circulating tumor DNA. *Oncotarget.* 20 janv 2016;8(8):13611-9.
78. Del Re M, Rofi E, Restante G, Crucitta S, Arrigoni E, Fogli S, et al. Implications of KRAS mutations in acquired resistance to treatment in NSCLC. *Oncotarget.* 21 déc 2017;9(5):6630-43.
79. Wu S-G, Chang Y-L, Yu C-J, Yang P-C, Shih J-Y. The Role of *PIK3CA* Mutations among Lung Adenocarcinoma Patients with Primary and Acquired Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibition. *Sci Rep.* 13 oct 2016;6:35249.

80. Oser MG, Niederst MJ, Sequist LV, Engelman JA. Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin. *Lancet Oncol*. avr 2015;16(4):e165-172.
81. Levin PA, Mayer M, Hoskin S, Sailors J, Oliver DH, Gerber DE. Histologic Transformation from Adenocarcinoma to Squamous Cell Carcinoma as a Mechanism of Resistance to EGFR Inhibition. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. sept 2015;10(9):e86-8.
82. Jukna A, Montanari G, Mengoli MC, Cavazza A, Covi M, Barbieri F, et al. Squamous Cell Carcinoma « Transformation » Concurrent with Secondary T790M Mutation in Resistant EGFR-Mutated Adenocarcinomas. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. avr 2016;11(4):e49-51.
83. Thomson S, Buck E, Petti F, Griffin G, Brown E, Ramnarine N, et al. Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cell lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition. *Cancer Res*. 15 oct 2005;65(20):9455-62.
84. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, et al. Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Sci Transl Med*. 23 mars 2011;3(75):75ra26.
85. Chae YK, Davis AA, Carneiro BA, Chandra S, Mohindra N, Kalyan A, et al. Concordance between genomic alterations assessed by next-generation sequencing in tumor tissue or circulating cell-free DNA. *Oncotarget*. 30 août 2016;7(40):65364-73.
86. Overman MJ, Modak J, Kopetz S, Murthy R, Yao JC, Hicks ME, et al. Use of research biopsies in clinical trials: are risks and benefits adequately discussed? *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 janv 2013;31(1):17-22.
87. Lin X, Fleisher M, Rosenblum M, Lin O, Boire A, Briggs S, et al. Cerebrospinal fluid circulating tumor cells: a novel tool to diagnose leptomeningeal metastases from epithelial tumors. *Neuro-Oncol*. 1 sept 2017;19(9):1248-54.
- 87'. Prud'homme R, Tapie B, Casagrande K, Favier R, Forestier G, Henrion B et al Electric System of Controlled Disrespect. *The journal of Schneckoulie* Oct 2018;87(6):13-19.
88. Lusardi TA, Phillips JI, Wiedrick JT, Harrington CA, Lind B, Lapidus JA, et al. MicroRNAs in Human Cerebrospinal Fluid as Biomarkers for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis JAD*. 2017;55(3):1223-33.
89. Msaouel P, Koutsilieris M. Diagnostic value of circulating tumor cell detection in bladder and urothelial cancer: systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 4 août 2011;11:336.
90. Du L, Jiang X, Duan W, Wang R, Wang lishui, Zheng G, et al. Cell-free microRNA expression signatures in urine serve as novel noninvasive biomarkers for diagnosis and recurrence prediction of bladder cancer. *Oncotarget*. 28 mars 2017;8(25):40832-42.
91. Aro K, Wei F, Wong DT, Tu M. Saliva Liquid Biopsy for Point-of-Care Applications. *Front Public Health [Internet]*. 11 avr 2017 [cité 28 janv 2019];5. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5387045/>
92. Giulietti M, Occhipinti G, Aless, Righetti R, Armeni T, Principato G, et al. Employment of Exosomes for Liquid Biopsies. *Transl Biomed [Internet]*. 2015 [cité 27 janv 2019];6(4).

Disponible sur: <http://www.transbiomedicine.com/abstract/employment-of-exosomes-for-liquid-biopsies-8010.html>

93. Rapado-González Ó, Majem B, Muínelo-Romay L, Álvarez-Castro A, Santamaría A, Gil-Moreno A, et al. Human salivary microRNAs in Cancer. *J Cancer*. 6 janv 2018;9(4):638-49.
94. Sun Y, Haglund TA, Rogers AJ, Ghanim AF, Sethu P. Review: Microfluidics technologies for blood-based cancer liquid biopsies. *Anal Chim Acta*. 5 juill 2018;1012:10-29.
95. Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med*. janv 2015;7(1):1-11.
96. Regalado A. New DNA Tests on Blood Can Catch Cancer Early [Internet]. MIT Technology Review. [cité 27 janv 2019]. Disponible sur: <https://www.technologyreview.com/s/529911/spotting-cancer-in-a-vial-of-blood/>
97. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. févr 2015;13(1):17-24.
98. Santoni M, Piva F, Scarpelli M, Cheng L, Lopez-Beltran A, Massari F, et al. The origin of prostate metastases: emerging insights. *Cancer Metastasis Rev*. déc 2015;34(4):765-73.
99. Zhang Y, Wang X-F. A niche role for cancer exosomes in metastasis. *Nat Cell Biol*. juin 2015;17(6):709-11.
100. Munoz JL, Bliss SA, Greco SJ, Ramkissoon SH, Ligon KL, Rameshwar P. Delivery of Functional Anti-miR-9 by Mesenchymal Stem Cell-derived Exosomes to Glioblastoma Multiforme Cells Conferred Chemosensitivity. *Mol Ther Nucleic Acids*. 1 oct 2013;2:e126.
101. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 9 juill 2015;523(7559):177-82.
102. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 27 janv 2019]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24710597>
103. Mayo-de-Las-Casas C, Jordana-Ariza N, Garzón-Ibañez M, Balada-Bel A, Bertrán-Alamillo J, Viteri-Ramírez S, et al. Large scale, prospective screening of EGFR mutations in the blood of advanced NSCLC patients to guide treatment decisions. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1 sept 2017;28(9):2248-55.
104. Izzotti A, Carozzo S, Pulliero A, Zhabayeva D, Ravetti JL, Bersimbaev R. Extracellular MicroRNA in liquid biopsy: applicability in cancer diagnosis and prevention. *Am J Cancer Res*. 1 juill 2016;6(7):1461-93.
105. Cazzoli R, Buttitta F, Di Nicola M, Malatesta S, Marchetti A, Rom WN, et al. microRNAs derived from circulating exosomes as noninvasive biomarkers for screening and diagnosing lung cancer. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. sept 2013;8(9):1156-62.

106. Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutat Res.* juin 2007;635(2-3):105-17.
107. Forsheew T, Murtaza M, Parkinson C, Gale D, Tsui DWY, Kaper F, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med.* 30 mai 2012;4(136):136ra68.
108. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* mars 1977;37(3):646-50.
109. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* avr 1994;86(4):774-9.
110. Thierry AR, Messaoudi SE, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev.* 2016;35(3):347.
111. Lehmann-Werman R, Neiman D, Zemmour H, Moss J, Magenheim J, Vaknin-Dembinsky A, et al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 29 mars 2016;113(13):E1826.
112. Caen O, Nizard P, Garrigou S, Perez-Toralla K, Zonta E, Laurent-Puig P, et al. PCR digitale en micro-compartiments - II. Apport pour la détection quantitative d'ADN tumoral circulant. *médecine/sciences.* 1 févr 2015;31(2):180-6.
113. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 févr 2014;32(6):579-86.
114. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* juin 2011;11(6):426-37.
115. BIOPSIE LIQUIDE : UN NOUVEL OUTIL DE RECHERCHE ET DE SOINS EN CANCÉROLOGIE. Dr Etienne ROULEAU Génétique et Pathologie moléculaire - PDF [Internet]. [cité 12 mars 2019]. Disponible sur: <https://docplayer.fr/48317198-Biopsie-liquide-un-nouvel-outil-de-recherche-et-de-soins-en-cancerologie-dr-etienne-rouleau-genetique-et-pathologie-moleculaire.html>
116. Vendrell JA, Mau-Them FT, Béganton B, Godreuil S, Coopman P, Solassol J. Circulating Cell Free Tumor DNA Detection as a Routine Tool for Lung Cancer Patient Management. *Int J Mol Sci* [Internet]. févr 2017 [cité 26 juill 2017];18(2). Disponible sur: [https://www-ncbi-nlm-nih.gov.gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC5343800/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC5343800/)
117. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 23 sept 2013;424:222-30.
118. Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion (Paris).* févr 2001;41(2):276-82.
119. Diaz IM, Nocon A, Mehnert DH, Fredebohm J, Diehl F, Holtrup F. Performance of Streck cfDNA Blood Collection Tubes for Liquid Biopsy Testing. *PLoS ONE* [Internet]. 2016 [cité 24 juill 2017];11(11). Disponible sur: [https://www-ncbi-nlm-nih.gov.gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC5104415/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC5104415/)

120. Jung M, Klotzek S, Lewandowski M, Fleischhacker M, Jung K. Changes in Concentration of DNA in Serum and Plasma during Storage of Blood Samples. *Clin Chem.* 1 juin 2003;49(6):1028-9.
121. Warton K, Lin V, Navin T, Armstrong NJ, Kaplan W, Ying K, et al. Methylation-capture and Next-Generation Sequencing of free circulating DNA from human plasma. *BMC Genomics* [Internet]. 15 juin 2014 [cité 12 nov 2018];15(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4078241/>
122. Roche Sequencing Unit Instructions for Use - IFU_cfDNA_IVD_FR.pdf [Internet]. [cité 3 août 2017]. Disponible sur: https://sftp.rch.cm//diagnostics/sequencing/literature/dna-collection/IFU_cfDNA_IVD_FR.pdf
123. Accessing Genetic Information with Liquid Biopsies. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 2 févr 2019]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26450339/>
124. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol.* août 2013;10(8):472-84.
125. Buder A, Tomuta C, Filipits M. The potential of liquid biopsies. *Curr Opin Oncol.* mars 2016;28(2):130-4.
126. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med.* avr 2014;20(4):430-5.
127. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 11 avr 1989;17(7):2503.
128. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3 août 1999;96(16):9236.
129. Yung TKF, Chan KCA, Mok TSK, Tong J, To K-F, Lo YMD. Single-Molecule Detection of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Plasma by Microfluidics Digital PCR in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 15 mars 2009;15(6):2076-84.
130. Zonta E, Garlan F, Pécuchet N, Perez-Toralla K, Caen O, Milbury C, et al. Multiplex Detection of Rare Mutations by Picoliter Droplet Based Digital PCR: Sensitivity and Specificity Considerations. *PLoS ONE* [Internet]. 2016 [cité 1 août 2017];11(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC4945036/>
131. Liu Q, Sommer SS. Pyrophosphorolysis-activated polymerization (PAP): application to allele-specific amplification. *BioTechniques.* nov 2000;29(5):1072-6, 1078, 1080 passim.
132. Thress KS, Brant R, Carr TH, Dearden S, Jenkins S, Brown H, et al. EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291. *Lung Cancer.* 1 déc 2015;90(3):509-15.
133. Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22 juill 2003;100(15):8817-22.

134. Li M, Diehl F, Dressman D, Vogelstein B, Kinzler KW. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nat Methods*. févr 2006;3(2):95-7.
135. Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7 juin 2011;108(23):9530-5.
136. Lung-Colon-Lung-Fusion-Panel- Flyer.pdf [Internet]. [cité 11 oct 2018]. Disponible sur: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Flyers/Lung-Colon-Lung-Fusion-Panel-%20Flyer.pdf>
137. Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NCW, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*. mai 2014;20(5):548-54.
138. Bratman SV, Newman AM, Alizadeh AA, Diehn M. Potential clinical utility of ultrasensitive circulating tumor DNA detection with CAPP-Seq. *Expert Rev Mol Diagn*. juin 2015;15(6):715-9.
139. Kivioja T, Vähärautio A, Karlsson K, Bonke M, Enge M, Linnarsson S, et al. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nat Methods*. 20 nov 2011;9(1):72-4.
140. Williams HL, Walsh K, Diamond A, Oniscu A, Deans ZC. Validation of the Oncomine™ focus panel for next-generation sequencing of clinical tumour samples. *Virchows Arch*. 2018;473(4):489-503.
141. Oncomine Lung cfDNA Assay - Thermo Fisher Scientific [Internet]. [cité 12 oct 2018]. Disponible sur: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A31149>
142. Knol AC, Vallée A, Herbreteau G, Nguyen J-M, Varey E, Gaultier A, et al. Clinical significance of BRAF mutation status in circulating tumor DNA of metastatic melanoma patients at baseline. *Exp Dermatol*. 1 oct 2016;25(10):783-8.
143. Maxwell RSC ccfDNA Plasma Kit [Internet]. [cité 26 févr 2019]. Disponible sur: <https://france.promega.com/products/dna-purification-quantitation/genomic-dna-purification/maxwell-rsc-ccfdna-plasma-kit/>
144. Ng SW, Amit H, Wei SL, Murfet H, LaFranzo N, Barker C, et al. Allelic Frequency Measurement of Multiplex I cfDNA Reference Standard Set using Droplet Digital™ PCR, Ion Torrent™ and MiSeq™. :2.
145. Bell DW, Haber DA. A Blood-Based Test for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 1 juill 2006;12(13):3875-7.
146. Thelwell N, Millington S, Solinas A, Booth J, Brown T. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res*. 1 oct 2000;28(19):3752-61.
147. theascreen EGFR RGQ PCR Kit Handbook - QIAGEN [Internet]. [cité 12 oct 2018]. Disponible sur: <https://www.qiagen.com/no/resources/resourcedetail?id=d217c9ca-b9f6-4891-8c46-32b71e83d88a&lang=fr-FR>
148. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 10 janv 1996;6(10):986-94.

149. MAN0017003_IonAmpliSeqLibraryKitPlus_UG.pdf [Internet]. [cité 12 oct 2018]. Disponible sur: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017003_IonAmpliSeqLibraryKitPlus_UG.pdf
150. DeAngelis MM, Wang DG, Hawkins TL. Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products. *Nucleic Acids Res.* 25 nov 1995;23(22):4742-3.
151. High Sensitivity_DNA_KG.pdf [Internet]. [cité 12 oct 2018]. Disponible sur: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/High%20Sensitivity_DNA_KG.pdf
152. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature.* 20 juill 2011;475(7356):348-52.
153. Basu AS. Digital Assays Part I: Partitioning Statistics and Digital PCR. *SLAS Technol.* 2017;22(4):369-86.
154. Song H, Chen DL, Ismagilov RF. Reactions in Droplets in Microfluidic Channels. *Angew Chem Int Ed Engl.* 13 nov 2006;45(44):7336-56.
155. Perez-Toralla K, Pekin D, Bartolo J-F, Garlan F, Nizard P, Laurent-Puig P, et al. PCR digitale en micro-compartiments - I. Détection sensible de séquences d'acides nucléiques rares. *médecine/sciences.* 1 janv 2015;31(1):84-92.
156. Baker M. Digital PCR hits its stride. *Nat Methods.* juin 2012;9(6):541-4.
157. taqman-dpcr-liquid-biopsy-quick-reference-protocol.pdf [Internet]. [cité 13 oct 2018]. Disponible sur: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/taqman-dpcr-liquid-biopsy-quick-reference-protocol.pdf>
158. Product Details [Internet]. [cité 14 oct 2018]. Disponible sur: https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/DPCR/Hs000000029_rm?CID=&ICID=&subtype=
159. Naidoo J, Sima C, Rodriguez K, Busby N, Nafa K, Ladanyi M, et al. EGFR exon 20 insertions in advanced lung adenocarcinomas: clinical outcomes and response to erlotinib. *Cancer.* 15 sept 2015;121(18):3212-20.
160. Rossi S, D'Argento E, Basso M, Strippoli A, Dadduzio V, Cerchiaro E, et al. Different EGFR Gene Mutations in Exon 18, 19 and 21 as Prognostic and Predictive Markers in NSCLC: A Single Institution Analysis. *Mol Diagn Ther.* févr 2016;20(1):55-63.
161. Murray C. Evaluating EGFR Genotyping using HDx™ Reference Standards. *BioTechniques* [Internet]. 1 mai 2015 [cité 17 oct 2018];58(5). Disponible sur: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/000114292>
162. Data [Internet]. [cité 18 oct 2018]. Disponible sur: <https://www.horizondiscovery.com/resources/support-materials/data>
163. Denis JA, Nectoux J, Lamy P-J, Sciellour CRL, Guermouche H, Alary A-S, et al. Development of digital PCR molecular tests for clinical practice: principles, practical implementation and recommendations. *Ann Biol Clin (Paris).* 1 sept 2018;76(5):505-23.

164. Zhang Y, Xu Y, Zhong W, Zhao J, Chen M, Zhang L, et al. Total DNA input is a crucial determinant of the sensitivity of plasma cell-free DNA EGFR mutation detection using droplet digital PCR. *Oncotarget*. 30 déc 2016;8(4):5861-73.
165. Zhao Y, Li Y, Chen P, Li S, Luo J, Xia H. Performance comparison of blood collection tubes as liquid biopsy storage system for minimizing cfDNA contamination from genomic DNA. *J Clin Lab Anal*. 7 sept 2018;e22670.
166. Henao Diaz E, Yachnin J, Grönberg H, Lindberg J. The In Vitro Stability of Circulating Tumour DNA. *PLoS ONE* [Internet]. 13 déc 2016 [cité 24 nov 2018];11(12). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5154581/>
167. Norton SE, Luna KK, Lechner JM, Qin J, Fernando MR. A new blood collection device minimizes cellular DNA release during sample storage and shipping when compared to a standard device. *J Clin Lab Anal*. juill 2013;27(4):305-11.
168. Norton SE, Lechner JM, Williams T, Fernando MR. A stabilizing reagent prevents cell-free DNA contamination by cellular DNA in plasma during blood sample storage and shipping as determined by digital PCR. *Clin Biochem*. oct 2013;46(15):1561-5.
169. Sueoka-Aragane N, Katakami N, Satouchi M, Yokota S, Aoe K, Iwanaga K, et al. Monitoring EGFR T790M with plasma DNA from lung cancer patients in a prospective observational study. *Cancer Sci*. févr 2016;107(2):162-7.
170. Marcq M, Vallée A, Bizieux A, Denis MG. Detection of EGFR Mutations in the Plasma of Patients with Lung Adenocarcinoma for Real-Time Monitoring of Therapeutic Response to Tyrosine Kinase Inhibitors? *J Thorac Oncol*. juill 2014;9(7):e49-50.
- 170'. Py A, Lescure V, Laneluc A, Sanglier F, Ramin L, Bouquerel R, Guinot B et al Why Schneckoulie System was better than Chabroulie. *The journal of Schneckoulie* May 2019;87(6):12-18.
171. Greig SL. Osimertinib: First Global Approval. *Drugs*. févr 2016;76(2):263-73.
172. Liu Y, Sun L, Xiong Z-C, Sun X, Zhang S-L, Ma J-T, et al. Meta-analysis of the impact of de novo and acquired EGFR T790M mutations on the prognosis of patients with non-small cell lung cancer receiving EGFR-TKIs. *OncoTargets Ther*. 24 avr 2017;10:2267-79.
173. Oncomine Lung cfDNA Assay - Thermo Fisher Scientific [Internet]. [cité 31 oct 2018]. Disponible sur: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A31149>
174. Ion PI Chip Kit v3 - Thermo Fisher Scientific [Internet]. [cité 31 oct 2018]. Disponible sur: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A26770>
175. Mok TS, Wu Y-L, Ahn M-J, Garassino MC, Kim HR, Ramalingam SS, et al. Osimertinib or Platinum–Pemetrexed in EGFR T790M–Positive Lung Cancer. *N Engl J Med*. 16 févr 2017;376(7):629-40.
176. Bulletin_6628.pdf [Internet]. [cité 30 oct 2018]. Disponible sur: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6628.pdf
177. Oxnard GR, Arcila ME, Sima CS, Riely GJ, Chmielecki J, Kris MG, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR mutant lung cancer: Distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 mars 2011;17(6):1616-22.

178. Oya Y, Yoshida T, Kuroda H, Shimizu J, Horio Y, Sakao Y, et al. Association Between EGFR T790M Status and Progression Patterns During Initial EGFR-TKI Treatment in Patients Harboring EGFR Mutation. *Clin Lung Cancer*. 2017;18(6):698-705.e2.
179. Soria J-C, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH, et al. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 11 janv 2018;378(2):113-25.
180. Jouvenot Y, Hefner E. Droplet DigitalTM PCR: Guidelines for Multiplexing Using Bio-Rad's QX100TM Droplet Digital PCR System. 2013;4.
181. Ricordel C, Friboulet L, Facchinetti F, Soria J-C. Molecular mechanisms of acquired resistance to third-generation EGFR-TKIs in EGFR T790M-mutant lung cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1 janv 2018;29(suppl_1):i28-37.
182. Venkatesh V, Li Y, Bramlett K, Dhingra D, Chien R, Varma K, et al. Orthogonal Verification of OncoPrint cfDNA Data with Digital PCR Using TaqMan dPCR Liquid Biopsy Assays. :1.

Annexes

Annexe 1. Ion AmpliSeq Colon and Lung Cancer Research Panel v2.....	132
Annexe 2. Oncomine™ Lung cfDNA Assay	133

Annexe 1. Ion AmpliSeq Colon and Lung Cancer Research Panel v2.

Sample type	FFPE samples
Application	Somatic mutation detection
Genes	<i>KRAS, EGFR, BRAF, PIK3CA, AKT1, ERBB2, PTEN, NRAS, STK11, MAP2K1, ALK, DDR2, CTNNB1, MET, TP53, SMAD4, FBX7, FGFR3, NOTCH1, ERBB4, FGFR1, and FGFR2</i>
Primer pairs, amplicon length	92 pairs of primers in a single pool 92 amplicons with an average length of 162 bp
Input DNA required	10 ng
Observed performance	Percent of amplicons with the target base coverage at 500x: >95% Average panel uniformity: 95% Average percent reads on target: 98%
Multiplexing	2 samples per Ion 314™ Chip with at least 500x sequencing coverage 8 samples per Ion 316™ Chip with at least 500x sequencing coverage 16 samples per Ion 318™ Chip with at least 500x sequencing coverage

Annexe 2. Oncomine™ Lung cfDNA Assay

Assay	Genes	Selected SNV hotspots
Oncomine™ Lung cfDNA Assay	<i>ALK, BRAF, EGFR, ERBB2, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS, PIK3CA, ROS1, and TP53</i>	>150 hotspots including: <i>EGFR</i> : T790M, C797S, L858R, Exon 19 del <i>KRAS</i> : G12X, G13X, Q61X <i>BRAF</i> : V600E <i>ALK</i> : Exon 21-25 <i>PIK3CA</i> : E545K, H1047R, E542K

Serment d'Hippocrate

En présence des maîtres de cette école, de mes 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 dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à 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 les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Détermination des conditions pré analytiques et analytiques optimales pour la recherche des mutations d'EGFR sur l'ADN tumoral circulant dans les cancers pulmonaires

Introduction : L'étude des mutations d'*EGFR* est nécessaire pour déterminer la prise en charge thérapeutique dans les cancers pulmonaires localement avancés ou métastatiques. L'utilisation de l'ADN tumoral circulant permet d'éviter des prélèvements invasifs. L'objectif de cette étude était de déterminer les conditions pré-analytiques et analytiques optimales pour la recherche des mutations d'EGFR L858R et T790M sur l'ADN tumoral circulant. **Méthode :** La longévité de conservation des tubes EDTA et Roche a été comparée par pyroséquençage ; puis les méthodes d'analyses : ARMS, Cobas, NGS et ddPCR ont été comparées au moyen des standards de références commerciaux Horizon. Enfin les méthodes déterminées comme les plus sensibles ont été utilisées pour analyser les biopsies liquides et tissulaires de 10 patients ayant récidivés sous ITK pour lesquels la mutation T790M n'avait pas été détectée initialement par nos techniques de routine. **Résultats :** Les tubes Roche ont permis une détection de la mutation L858R de manière stable jusqu'à J3 contrairement aux tubes EDTA. La ddPCR et le NGS, avec panel Oncomine ciblé sur le poumon, étaient les seules techniques permettant une détection de la mutation T790M à une fréquence allélique de 0,1%. La ddPCR a permis de mettre en évidence cette mutation T790M chez 4 de nos 10 patients initialement négatifs. **Discussion :** La meilleure sensibilité avec les tubes Roche est liée à la présence d'un conservateur cellulaire qui limite la lyse des globules blancs et le relargage de leur contenu en ADN génomique. La ddPCR cumule à la fois une sensibilité de détection jusqu'à 0,1 % de fréquence allélique pour la mutation T790M et une rapidité de rendu des résultats. Cette technique a permis d'améliorer notre fréquence de détection de la mutation T790M, avec pour 4 des 10 patients une indication à un traitement par ITK de 3^{ème} génération.

Mots-clés : ADN tumoral circulant, EGFR, T790M, Roche cfDNA, PCR digitale, Oncomine

Determination of optimal pre-analytical and analytical conditions for the detection of EGFR mutations in circulating DNA from lung cancers

Introduction: The study of EGFR mutations is necessary to determine therapeutic management in locally advanced or metastatic lung cancer. The use of circulating tumor DNA avoids invasive sampling. The objective of this study was to determine the optimal pre-analytical and analytical conditions for the detection of L858R and T790M EGFR mutations in circulating tumor DNA. **Method:** The shelf life of EDTA and Roche tubes was compared by pyrosequencing; then the analytical methods: ARMS, Cobas, NGS and ddPCR were compared using the HDxTM commercial reference standards. Finally, the methods identified as the most sensitive were used to analyze the liquid and tissue biopsies of 10 patients who had relapsed under ITK for whom the T790M mutation had not initially been detected by our routine techniques. **Results:** Roche tubes allowed stable detection of the L858R mutation up to J3 unlike EDTA tubes. The ddPCR and the NGS, with the Oncomine panel targeted on the lung, were the only techniques allowing detection of the T790M mutation at an allele frequency of 0.1%. The ddPCR showed this T790M mutation in 4 of our 10 initially negative patients. **Discussion:** The best sensitivity with Roche tubes is related to the presence of a cellular preservative that limits the lysis of white blood cells and the release of their genomic DNA content. The ddPCR combines both a detection sensitivity of up to 0.1% allelic frequency for the T790M mutation and a rapid rendering of results. This technique has improved our detection frequency of the T790M mutation, with 4 of the 10 patients indicated for 3rd generation ITK treatment.

Keywords : Cell-Free Circulating Tumor DNA, EGFR, T790M, Roche cfDNA, Digital Droplet PCR, Oncomine

