

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2014

N° 152

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

par

Mehdi Sakka

Né le 04/10/1984 à Hammamet (Tunisie)

Présentée et soutenue publiquement le 23 octobre 2014

**Etude du statut mutationnel EGFR dans l'ADN
circulant plasmatique chez douze patients ayant un
cancer pulmonaire non à petites cellules traités par
inhibiteur de tyrosine kinase**

Président : Monsieur le Professeur Jean-Marie BARD

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Marc DENIS

Membres du jury : Madame le Docteur Acya BIZIEUX

Monsieur le Professeur Stéphane BEZIEAU

Table des matières

Remerciements	3
Liste des figures.....	5
Liste des tableaux.....	6
Liste des abréviations.....	8
Introduction.....	9
Première partie : Revue bibliographique	10
I. Cancer pulmonaire en france	10
1. Epidémiologie.....	10
2. Types histologiques.....	11
3. Facteurs de risques du cancer pulmonaire	12
4. Classification TNM.....	12
5. Critères d'évaluation RECIST	14
II. EGFR : découverte, intérêt, type mutation biopsie.....	15
1. EGFR : Rôle physiologique.....	15
2. EGFR : rôle oncogénique	16
3. Inhibiteurs de Tyrosine Kinase : erlotinib et gefitinib	17
4. TKI : Essai de phase III et AMM	19
5. Effets secondaires du gefitinib et de l'erlotinib	22
6. AMM en France.....	23
7. Inhibiteur de deuxième génération.....	23
8. Plan cancer et plateformes de biologie moléculaire.....	23
9. Techniques de recherche des mutations EGFR dans le tissu biopsié.....	24
10. Mutation de résistance	24
11. Inhibiteur de 3 ^{ème} génération	27
III. Intérêt de la quantification des ADN circulants dans le cancer pulmonaire non à petites cellules.....	28
1. Histoire de l'ADN circulant	28
2. ADN circulant et aspect quantitatif : évaluation pronostique	29
IV. Intérêt de la recherche d'anomalie d'EGFR dans l'ADN circulant.....	34
1. Avantages par rapport aux biopsies.....	34
2. Intérêt en cancérologie de la recherche d'anomalie dans l'ADN circulant.....	36
3. Techniques utilisées pour la recherche d'anomalies d'EGFR.....	37
4. Intérêt pronostique	39
5. Intérêt dans le suivi du traitement.....	39

Deuxième partie : travail réalisé	41
I. Matériels et méthodes	41
1. Déroulement de l'étude	41
2. Critères d'inclusions	41
3. Critères d'exclusions.....	41
4. Recherche de mutations activatrice de l'EGFR : dans le tissu cancéreux	41
5. Recherche de mutations activatrice de l'EGFR : dans le plasma.....	44
6. Méthodologie	45
II. Résultats	46
1. Caractéristiques des patients	46
2. Altérations du gène EGFR dans l'ADN plasmatique et réponse initiale au traitement.....	47
3. Apparition de la mutation de résistance T790M.....	49
4. Suivi longitudinal des patients pendant le traitement.....	49
III. Discussion	56
Bibliographie.....	58

Remerciements

Je tiens à remercier :

Monsieur le Professeur Jean-Marie BARD

Pour avoir accepté de présider ce jury,

Veillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

Monsieur le Professeur Marc DENIS,

Pour m'avoir confié ce travail passionnant,

Pour avoir été patient et m'avoir encadré,

Veillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude.

Madame le Docteur Acya BIZIEUX

Pour sa participation dans ce projet,

Pour m'avoir reçu plusieurs fois à la Roche sur Yon,

Veillez trouver ici l'assurance de mes sincères remerciements.

Monsieur le Professeur Stéphane BEZIEAU

Pour l'honneur que vous me faites de juger ce travail,

Je vous témoigne ma très vive reconnaissance.

Le laboratoire de biochimie et à la plateforme de génétique moléculaire des cancers,

A Audrey Vallée pour tout son travail et son encadrement,

Aux techniciens pour leur aide.

A ma famille à qui je dédie cette thèse

A mes parents et à ma sœur,

Pour leur soutien et leurs encouragements,

A Julie,

Qui m'a encouragé dans les moments difficiles et m'a aidé dans la relecture,

Tu es toujours là quand j'ai besoin de toi.

A mes amis

Yassine, Ellie, Kamou, Shadi, nous avons fait un long parcours depuis la Tunisie,

Guillaume, nous arrivons enfin à voir la fin,

A tous mes co-internes nantais pour ces années passées à vos côtés,

A mes co-internes brestois pour leur accueil chaleureux.

Liste des figures

FIGURE 1 : EVOLUTION DE L'INCIDENCE DE CANCER PULMONAIRE EN FRANCE DE 1980 A 2013 (1)	10
FIGURE 2 : COUPE HISTOLOGIQUE D'UN CARCINOME MALPIGHIEN (2)	11
FIGURE 3: COUPES HISTOLOGIQUES DE DIFFERENTES FORMES D'ADENOCARCINOME (2)	11
FIGURE 4 : VOIES DE SIGNALISATION D'EGFR (12)	15
FIGURE 5 : REPARTITION DES ANOMALIES MOLECULAIRES DANS LE CANCER PULMONAIRE (13)	16
FIGURE 6 : REPARTITION DES ANOMALIES MOLECULAIRES DANS LE GENE EGFR SUR LES EXONS 18 A 21 (15)	17
FIGURE 7 : POURCENTAGE D'ACTIVATION D'EGFR EN FONCTION DU LIGAND EGF ET DU TYPE DE MUTATION DANS LE TISSU TUMORAL (21)	18
FIGURE 8 : POURCENTAGE D'ACTIVATION D'EGFR EN FONCTION DU LIGAND EGF ET DU TYPE DE MUTATION EN PRESENCE D'INHIBITEUR DANS LE TISSU TUMORAL (21)	18
FIGURE 9 : COURBES DE KAPLAN MEIER DES DIFFERENTS SOUS-GROUPES COMPARANT LES TRAITEMENTS (26)	20
FIGURE 10 : SURVIE SANS PROGRESSION ENTRE GROUPES TRAITES PAR GEFITINIB ET PAR CISPLATINE ASSOCIE AU DOCETAXEL (27)	21
FIGURE 11 : SURVIE SANS PROGRESSION ENTRE GROUPES TRAITES PAR ERLOTINIB ET PLACEBO (28)	21
FIGURE 12 : PHOTOGRAPHIE D'UNE FOLLICULITE SOUS ERLOTINIB (35)	22
FIGURE 13 : CARTE DES PLATEFORMES DE GENETIQUE MOLECULAIRE DES CANCERS (1)	24
FIGURE 14 : CRISTALLOGRAPHIE DE L'EGFR ET INTERACTION AVEC L'ERLOTINIB (45)	25
FIGURE 15 : CROISSANCE TUMORALE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN GEFITINIB (47)	25
FIGURE 16 : DIAGRAMME DE LA REPARTITION DES RESISTANCES ACQUISES AUX INHIBITEURS DE TYROSINE KINASE D'APRES CORTOT (57)	26
FIGURE 17 : MECANISMES POSSIBLES DU RELARGAGE DES ADN CIRCULANTS D'ORIGINE TUMORALE (64)	28
FIGURE 18 : COMPARAISON D'ADN CIRCULANT ENTRE SERUM ET PLASMA EN FONCTION DE LA TAILLE TUMORALE D'ORIGINE HUMAINE (66)	29
FIGURE 19 : CONCENTRATION D'ADN CIRCULANT PLASMATIQUE A T0 SELON LES STADES DE CANCER (68)	30
FIGURE 20 : DIFFERENCE DE CONCENTRATION D'ADN ENTRE PLASMA ET SERUM EN FONCTION DU TEMPS AVANT CENTRIFUGATION (71)	30
FIGURE 21 : DIFFERENCE DE CONCENTRATIONS D'ADN ENTRE DIFFERENTS ANTICOAGULANTS (73)	31
FIGURE 22 : COURBE ROC DE LA CONCENTRATION D'ADN CIRCULANT POUR LE PRONOSTIC DU CANCER A 20 NG/ML (77)	32
FIGURE 23 : CONCENTRATION D'ADN SELON LE STADE DU CANCER (80)	32
FIGURE 24 : SURVIE CUMULEE SELON LA CONCENTRATION EN ADN CIRCULANT AVEC UN SEUIL A 49.9 NG/ML DE HTERT (81)	33
FIGURE 25 : MODELES EXPLIQUANT LA VARIATION TUMORALES ENTRE LES METASTASES ET LA TUMEUR (82)	34
FIGURE 26 : EVOLUTION DES LIGNEES DANS LES DIFFERENTES SOUS POPULATIONS (83).	35
FIGURE 27 : BIOPSIES REALISEES SUR LA TUMEUR (84)	35
FIGURE 28 : ARBRE PHYLOGENETIQUE DES ANOMALIES RETROUVEES DANS LES DIFFERENTES POPULATIONS BIOPSIEES (84)	36
FIGURE 29 : COMPARAISON DE LA DIFFERENCE DE CT OBTENU ENTRE SERUM ET PLASMA (84)	36
FIGURE 30 : TECHNIQUE WIP QP POUR LA RECHERCHE D'ANOMALIE EGFR DANS LE PLASMA (91)	37
FIGURE 31 : DETECTION DU GENE APC MUTE ET DU GENE KRAS DANS LE SUIVI DU TRAITEMENT DU CANCER COLO-RECTAL (94)	39
FIGURE 32 : SUIVI DES ANOMALIES EGFR DANS LE PLASMA.	40
FIGURE 33 : ETAPES DE L'EXTRACTION DE L'ADN SUR LE KIT IPREP	42
FIGURE 34 : EXEMPLE DE PCR SPECIFIQUE D'ALLELE POUR LA RECHERCHE DE L858R	43
FIGURE 35 : GEL DES FRAGMENTS AMPLIFIES POUR LA RECHERCHE DE DELETION DE L'EXON 19	43
FIGURE 36 : ANOMALIES RECHERCHEES PAR LE KIT THERASCREEEN	44
FIGURE 37 : REPARTITION DES PATIENTS SELON LEURS CARACTERISTIQUES	47
FIGURE 38 : EVOLUTION DU PATIENT 5	49

FIGURE 39 : EVOLUTION DU PATIENT 8	50
FIGURE 40 : EVOLUTION DU PATIENT 1	50
FIGURE 41 : EVOLUTION DU PATIENT 2	51
FIGURE 42 : EVOLUTION DU PATIENT 3	51
FIGURE 43 : EVOLUTION DU PATIENT 4	52
FIGURE 44: EVOLUTION DU PATIENT 6	52
FIGURE 45 : EVOLUTION DU PATIENT 7	53
FIGURE 46 : EVOLUTION DU PATIENT 9	53
FIGURE 47 : EVOLUTION DU PATIENT 10	54
FIGURE 48 : EVOLUTION DU PATIENT 11	54
FIGURE 49 : EVOLUTION DU PATIENT 12	55

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : INCIDENCE ET MORTALITE DES 5 CANCERS LES PLUS IMPORTANTS EN 2012 (1)	10
TABLEAU 2 : CLASSIFICATION TNM PAR STADE DE CANCER PULMONAIRE (8)	13
TABLEAU 3 : FACTEURS PREDICTIFS DE LA PRESENCE D'UNE MUTATION EGFR CHEZ LES PATIENTS EUROPEENS (1)	17
TABLEAU 4 : PRINCIPALES TOXICITES LIEES AUX TRAITEMENTS PAR INHIBITEUR DE TYROSINE KINASE (36)	22
TABLEAU 5 : RESULTATS DE LA META-ANALYSE SUR LES TECHNIQUES DE L'EGFR CIRCULANT (92)	38
TABLEAU 6 : SENSIBILITE ET SPECIFICITE DE LA RECHERCHE D'EGFR DANS LE PLASMA PAR RAPPORT A LA BIOPSIE (31)	38
TABLEAU 7 : CARACTERISTIQUES DES 12 PATIENTS ETUDIES	46
TABLEAU 8: PATIENTS DONT L'ADN PLASMATIQUE A ETE TESTE APRES 1 MOIS DE TRAITEMENT	48
TABLEAU 9 : PATIENTS DONT L'ADN PLASMATIQUE A ETE TESTE APRES 2 MOIS DE TRAITEMENT	48
TABLEAU 10 : PATIENT DONT L'ADN PLASMATIQUE A ETE TESTE APRES 4 MOIS DE TRAITEMENT	48
TABLEAU 11 : RECHERCHE D'ANOMALIE DANS LE PLASMA A LA PREMIERE EVALUATION SELON LA PROGRESSION DE LA MALADIE	49

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

AMM : autorisation de mise sur le marché

Ct : *Cycle Threshold* ou cycle seuil

EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor* ou récepteur au facteur de croissance épidermique ou HER1

INCa : institut national du cancer

PCR : *Polymerase Chain Reaction* ou réaction de polymérisation en chaîne

PP : progression de la maladie

RC : réponse complète

RECIST : *Response Evaluation Criteria in Solid Tumours* ou critères d'évaluation de réponse aux tumeurs solides

RP : réponse partielle

RS : réponse stable

TDM : tomодensitométrie

TGF α : *Transforming growth factor alpha* ou facteur de croissance de transformation alpha

TKI : *Tyrosine kinase inhibitor* ou inhibiteur de tyrosine kinase

Introduction

Le cancer pulmonaire est le quatrième cancer le plus fréquent en France et c'est celui qui a la mortalité la plus élevée. Depuis le début des années 2000 de nouvelles molécules qui ciblent le récepteur de l'EGF améliorent la prise en charge de ce type de cancer. Des découvertes récentes ont permis montrer que ces thérapies ciblées sont efficaces lorsque le tissu cancéreux du patient présente une mutation activatrice du gène EGFR. Ces altérations sont recherchées en routine dans des plateformes de génétique moléculaire des cancers.

Depuis quelques années, les biologistes du laboratoire de biochimie du CHU de Nantes, qui font partie de la plateforme de génétique moléculaire des cancers, s'intéressent à l'ADN retrouvé dans la circulation sanguine des patients. Ils ont pu montrer que chez la plupart des patients présentant une mutation du gène EGFR dans leur tumeur, la même mutation était retrouvée dans l'ADN plasmatique.

Il reste maintenant à déterminer l'intérêt de l'analyse de ces « biopsies liquidiennes » chez les patients en cours de traitement par un inhibiteur de l'EGFR. Cette analyse permet-elle de déterminer précocement si le patient répond au traitement ? De prédire une rechute clinique du patient ? D'identifier les mécanismes moléculaires de résistance ?

Pour répondre à ces questions, nous avons analysé les résultats des tests réalisés chez 12 patients traités par inhibiteur d'EGFR, suivis au CH de La Roche sur Yon et au CHU de Nantes. Ces données seront présentées et discutées après un rappel des généralités sur le cancer pulmonaire, la découverte d'EGFR et la mise en place des traitements par inhibiteur de tyrosine kinase, puis l'intérêt de l'ADN circulant en cancérologie.

Première partie : Revue bibliographique

I. CANCER PULMONAIRE EN FRANCE

1. Epidémiologie

Le cancer pulmonaire est le quatrième cancer le plus fréquent en France, selon les données de l'institut national du cancer (INCa), avec une incidence de 40 000 cas pour l'année 2012. La survie moyenne à 5 ans est de 15% et c'est le cancer à l'origine du plus grand nombre de décès, avec 30 000 décès en 2012 soit 20% par rapport à l'ensemble des cancers (1) (tableau 1).

Tableau 1 : Incidence et mortalité des 5 cancers les plus importants en 2012 (1)

Localisations	Incidence		Mortalité	
	Effectif*	Contribution à l'ensemble des cancers (en %)	Effectif	Contribution à l'ensemble des cancers (en %)
Prostate*	53 465	15,0	8 876	6,0
Sein	48 763	13,7	11 886	8,0
Côlon-rectum	42 152	11,9	17 722	11,9
Poumon	39 495	11,1	29 949	20,2
Tous cancers	355 534	100,0	148 378	100,0

L'âge moyen du diagnostic est à 65 ans chez les hommes et 64 ans chez les femmes. Dans les deux tiers des cas, le diagnostic se fait à un stade avancé ce qui explique cette mortalité.

L'incidence est en hausse, essentiellement due à une augmentation de 5.4% par an de l'incidence chez la femme liée à l'augmentation de la consommation tabagique (figure 1).

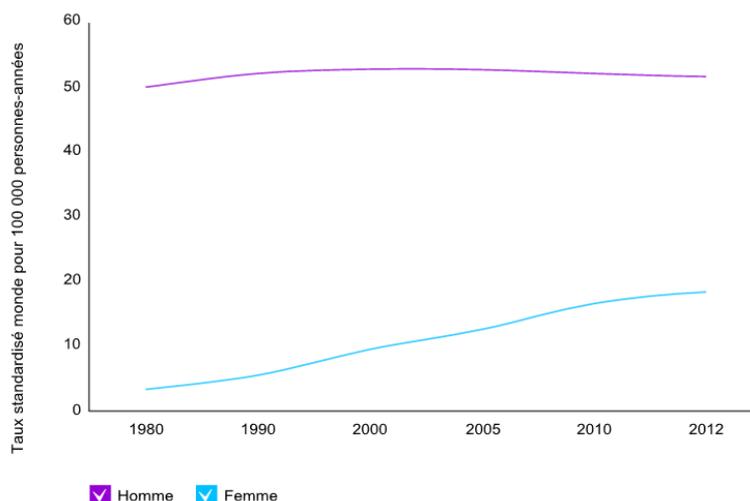


Figure 1 : Evolution de l'incidence de cancer pulmonaire en France de 1980 à 2013 (1)

2. Types histologiques

Les cancers du poumon sont classés en deux grandes parties : les carcinomes non à petites cellules qui dérivent des cellules souches de la muqueuse broncho-pulmonaire et les carcinomes à petites cellules.

Les carcinomes non à petites cellules représentent 80 % des cas et sont répartis en deux catégories : les carcinomes épidermoïdes et les adénocarcinomes.

Les carcinomes épidermoïdes ou malpighiens (figure 2) représentent 30 % des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC). Ils surviennent la plupart du temps chez des patients fumeurs.

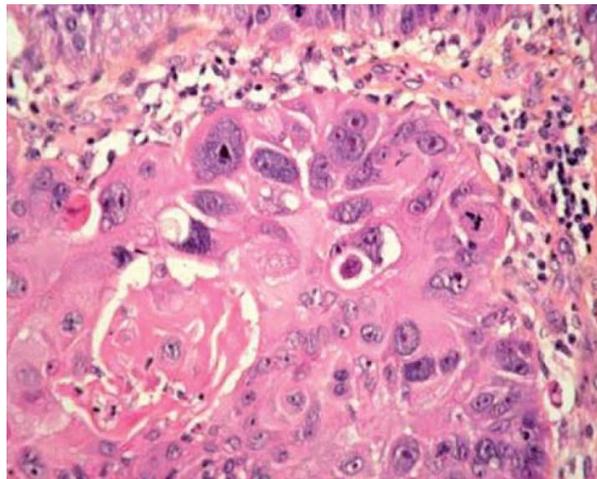


Figure 2 : coupe histologique d'un carcinome malpighien (2)

Les adénocarcinomes sont en augmentation dans les pays occidentaux en particulier chez la femme (3). Une nouvelle classification a été proposée en 2011 et devrait être mise dans la prochaine classification de l'OMS (4). Elle distingue les lésions pré-invasives, les adénocarcinomes à invasion minimale et les adénocarcinomes invasifs. Plusieurs architectures sont distinguées : acinaire, papillaire, micropapillaire, solide et lépidique (figure 3).

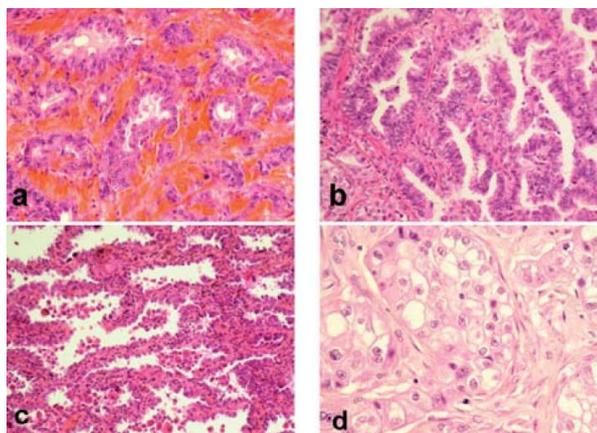


Figure 3: coupes histologiques de différentes formes d'adénocarcinome (2)

A : acinaire, B : papillaire, C : lépidique et D : solide

3. Facteurs de risques du cancer pulmonaire

Le principal facteur de risque des cancers broncho-pulmonaires est le tabagisme actif ou passif. Il est la cause de près de 85 % des cancers broncho-pulmonaires. Des résidus de goudron cancérigènes sont retrouvés chez les non-fumeurs subissant un tabagisme passif (5).

D'autres facteurs environnementaux ou professionnels sont reconnus cancérogènes comme l'amiante, le gaz d'échappement des moteurs diesel, le radon, l'arsenic, le nickel, le cobalt, le chrome, les hydrocarbures polycycliques aromatiques, l'exposition à certains rayonnements ionisants, la silice et le cadmium (6).

Pour une personne exposée à l'amiante, le risque de cancer broncho-pulmonaire est multiplié par 5 chez un patient non tabagique et multiplié par 50 chez un patient tabagique.

D'autres facteurs semblent impliqués dans le cancer broncho-pulmonaire mais dont leur l'imputabilité n'est pas totalement démontrée comme pour le cannabis inhalé (7), les antécédents d'irradiation thoracique pour une maladie de Hodgkin ou un cancer du sein, ou une exposition professionnelle ou accidentelle aux rayonnements ionisants.

4. Classification TNM

En 2009 est parue la septième édition de la classification des cancers pulmonaires (8) .

La classification TNM repose sur trois paramètres : le T pour la tumeur primitive, le N pour les ganglions pathologiques et le M pour les métastases. Pour le T, voici la classification

- TX : Tumeur qui ne peut être évaluée ou il est démontré la présence de cellules malignes dans les expectorations ou un lavage bronchique sans visualisation de la tumeur par des examens endoscopiques ou d'imagerie.
- T0 : Il n'y a pas de mise en évidence d'une tumeur primitive.
- Tis : Le carcinome est in situ.
- T1 : La tumeur fait 3 cm ou moins dans sa plus grande dimension et est entourée par le poumon ou la plèvre viscérale, sans mise en évidence bronchoscopique d'invasion plus proximale que la bronchique lobaire.
- T1a : La tumeur fait 2 cm ou moins dans sa plus grande dimension.
- T1b : La tumeur fait plus de 2 cm sans dépasser 3 cm dans sa plus grande dimension.
- T2 : La tumeur fait plus de 3 cm sans dépasser 7 cm dans sa plus grande dimension ou présente une des caractéristiques suivantes :
 - atteinte de la bronche souche à 2 cm ou plus de la carène.
 - invasion de la plèvre viscérale.
 - présence d'une atélectasie ou d'une pneumopathie obstructive s'étendant à la région hilare sans atteindre l'ensemble du poumon.
- T2a : La tumeur fait plus de 3 cm sans dépasser 5 cm dans sa plus grande dimension.
- T2b : La tumeur fait plus de 5 cm sans dépasser 7 cm dans sa plus grande dimension.

- T3 : La tumeur fait plus de 7 cm ou
 - envahie directement une des structures suivantes : la paroi thoracique, le diaphragme, le nerf phrénique, la plèvre médiastinale, pleurale ou pariétale ou le péricarde.
 - la tumeur dans la bronche souche est à moins de 2 cm de la carène sans l'envahir.
 - est associée à une atélectasie ou d'une pneumopathie obstructive du poumon entier
 - il y a la présence d'un nodule tumoral distinct dans le même lobe.
- T4 : La tumeur quelque soit sa taille envahie directement une des structures suivantes : médiastin, cœur, grands vaisseaux, trachée, nerf laryngé récurrent, œsophage, corps vertébral, carène; ou présence d'un nodule tumoral distinct dans un autre lobe du poumon atteint.

Pour le N : les ganglions lymphatiques régionaux, voici la classification :

- NX : les ganglions ne peuvent pas être évalués.
- N0 : aucune métastase ganglionnaire lymphatique régionale.
- N1 : une ou plusieurs métastases dans les ganglions lymphatiques intrapulmonaires, péribronchiques ou hilaires latéraux, y compris par envahissement direct.
- N2 : métastases dans les ganglions lymphatiques médiastinaux latéraux ou sous-carinaires.
- N3 : métastase dans les ganglions lymphatiques médiastinaux controlatéraux, hilaires controlatéraux, scalènes ou sous-claviculaires latéraux ou controlatéraux.

Pour le M, les métastases à distance, la classification donne :

- MX : les métastases à distance n'ont pas pu être évaluées.
- M0 : absence de métastase à distance.
- M1 : une ou des métastases à distance.
- M1a : Au moins un nodule tumoral distinct dans un lobe controlatéral ; tumeur avec nodules pleuraux ou épanchement pleural (ou péricardique) malin.
- M1b : métastase à distance.

Une fois le TNM déterminé, la classification se fait par 4 stades (tableau 2).

Tableau 2 : classification TNM par stade de cancer pulmonaire (8)

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

La classification TNM permet de distinguer différents groupes, plus le stade est élevé moins le pronostic sera favorable.

5. Critères d'évaluation RECIST

La version 1.1 du RECIST (9) pour *Response Evaluation Criteria in Solid Tumours* remplace la version 1.0 qui datait de 2000, et permet de définir la taille de tumeur mesurable d'une tumeur solide.

La tumeur est mesurable si la taille est supérieure à 10 mm au scanner, 20 mm à la radiographie thoracique. Elle n'est pas mesurable si la taille est inférieure à 10 mm.

L'évaluation du traitement devrait se faire de préférence avant quatre semaines après le début du traitement. Pour le calcul, la somme des diamètres de toutes les lésions est prise en compte, diamètre mesuré sur le plus grand côté.

Pour l'évaluation des ganglions pathologiques, leurs mesures sont prises en compte si le ganglion dans son côté le moins important fait plus de 15 mm.

Au maximum cinq lésions cibles sont sélectionnées au total avec un maximum de deux lésions cibles par organe. La sélection des lésions cibles s'opérera de façon à être représentative de tous les organes envahis, en choisissant les lésions les plus grandes dans leur plus grande dimension qui de plus, pourront être suivies tout au long de l'essai avec la méthode utilisée lors de l'examen initial.

C'est la somme des diamètres de ces lésions cibles de plus grand axe pour les lésions, et de plus petit axe pour les ganglions qui sera suivie au long de l'essai pour évaluer la réponse ou la progression.

Trois types de réponses sont ainsi établis et aident pour le suivi et l'évaluation du traitement :

- Réponse complète (RC) correspond à une disparition des cibles et les ganglions pathologiques doivent avoir une réduction de leur axe inférieur strictement à 10mm.
- Réponse partielle (RP) correspond à la réduction de 30% sur la somme des diamètres.
- Progression de la maladie correspond à 20% d'augmentation sur la somme des diamètres et en valeur absolue une augmentation de 5mm.
- Réponse stable ne correspond à aucun des autres critères.

Ces critères permettent de standardiser l'évaluation d'un traitement des tumeurs solides et le score RECIST est utilisé dans un groupe d'études notamment dans le cancer pulmonaire non à petites cellules.

II. EGFR : DECOUVERTE, INTERET, TYPE MUTATION BIOPSIE

1. EGFR : Rôle physiologique

EGFR est une glycoprotéine transmembranaire constituée d'une chaîne polypeptidique. Il est codé par le proto-oncogène c-erbB1 qui comporte 188 307 paires de bases et se situe sur le chromosome 7. Le gène donnera 4 variants de protéines. Le variant 1 contient 28 exons soit 1210 acides aminés. Il correspond au récepteur à l'EGF ou EGFR et se nomme également HER1 pour *Human Epithelial Receptor*.

La partie extracellulaire se divise en 4 domaines : deux domaines de liaison à l'EGF (I et III) et deux domaines riches en Cystéine (II et IV). Les ligands principaux sont l'EGF et le TGF α .

La partie intracellulaire comporte un domaine de régulation et un domaine tyrosine kinase. L'EGFR fait partie de la famille des récepteurs à tyrosine kinase. Le récepteur a un rôle dans la transduction du signal cellulaire (10).

La voie de signalisation se fera en 3 étapes : la première correspond à la fixation du ligand spécifique au niveau du domaine extracellulaire du récepteur. La deuxième correspond à la formation d'un dimère avec phosphorylation ATP dépendante de résidus tyrosine dans la partie intracellulaire. La dernière étape induit l'activation de la voie de signalisation intracellulaire (11).

Les voies de signalisation intracellulaires sont la voie RAS-RAF-MEK-MAPK qui contrôle la transcription de gènes, la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S et la prolifération cellulaire. La voie PI3K-Akt active une cascade de signaux anti-apoptotiques via bFGF, HB-EGF, MAPK, PI3K, TGF α et VEGF (figure 4).

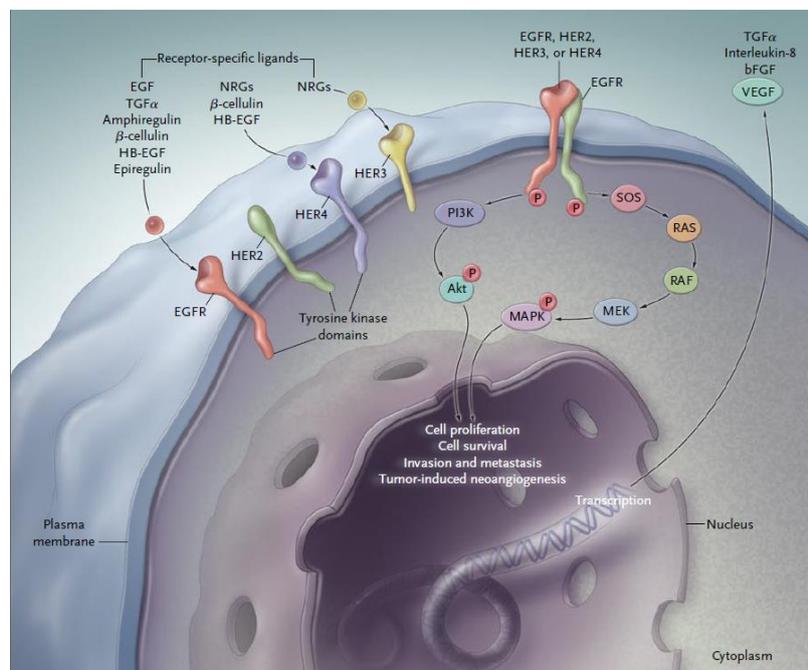


Figure 4 : Voies de signalisation d'EGFR (12)

2. EGFR : rôle oncogénique

En 2014, un regroupement de chercheurs oncogénéticiens publie (13) les différentes anomalies moléculaires que l'on peut retrouver dans le cancer pulmonaire. Les anomalies d'EGFR représentent près de 11 % des anomalies retrouvées dans la population étudiée (figure 5). Dans 24.4 % aucune anomalie n'est retrouvée.

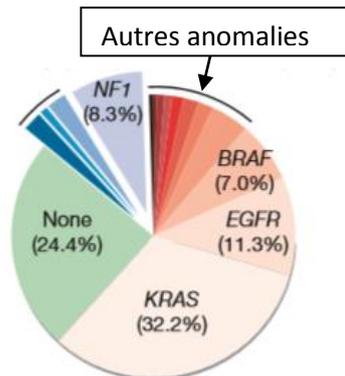


Figure 5 : Répartition des anomalies moléculaires dans le cancer pulmonaire (13)

Le rôle d'EGFR en cancérologie est connu depuis les années 1980 (14). En cas de dysrégulation de l'EGFR, une activation importante pourra avoir lieu et entraînera une dimérisation importante et anormale aboutissant à l'autophosphorylation de son extrémité intracellulaire. La cascade intracellulaire sera activée et augmentera l'activité tumorale, sa résistance à l'apoptose et sa capacité d'invasion locale.

Dans le gène EGFR, les altérations sont essentiellement retrouvées dans 4 exons (figure 6), les exons 18 à 21, qui codent pour le domaine à activité tyrosine kinase (15).

Les mutations les plus fréquentes sont dans 60 % des cas les délétions dans l'exon 19 qui vont toujours du résidu leucine 747 à l'acide glutamique en position 749, dans 25 % des cas la mutation qui remplace une leucine par une arginine en position 858 (L858R) dans l'exon 21. Les autres mutations sont plus rares et se trouvent dans les exons 18 à 21.

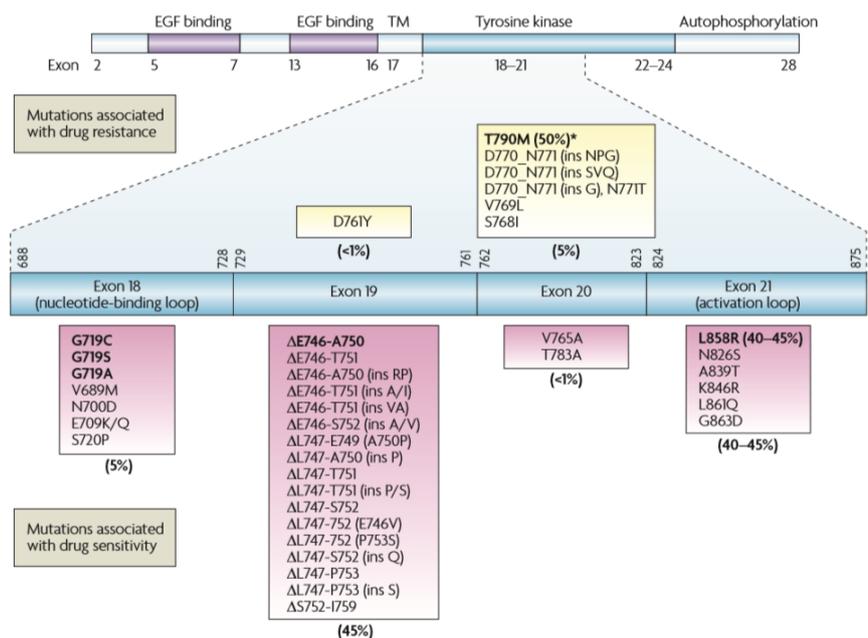


Figure 6 : Répartition des anomalies moléculaires dans le gène EGFR sur les exons 18 à 21 (15)

Les facteurs prédisant la présence d'une mutation de l'EGFR chez des patients européens sont résumés dans le tableau 3 (1).

Tableau 3 : Facteurs prédictifs de la présence d'une mutation EGFR chez les patients européens (1)

FACTEURS CLINIQUES	P VALUE	PROBABILITÉ D'ÊTRE EGFR+
Fumeurs/non-fumeurs	< 0,0001	6,5 fois plus élevée chez les patients n'ayant jamais fumé que chez les fumeurs 28/70 (40 %) des non-fumeurs sont EGFR+ 47/716 (7 %) des fumeurs sont EGFR+
Histologie	< 0,0001	4,4 fois plus élevée pour les adénocarcinomes que pour les non-adénocarcinomes 63/396 (16 %) des patients avec un adénocarcinome sont EGFR+ 12/390 (3 %) des patients avec un non-adénocarcinome sont EGFR+
Sexe	0,0397	1,7 fois plus élevée chez les femmes que chez les hommes 40/235 (17 %) des femmes sont EGFR+ 35/551 (6 %) des hommes sont EGFR+

3. Inhibiteurs de Tyrosine Kinase : erlotinib et gefitinib

Dans le milieu des années 90, une surexpression de EGFR en immunohistochimie est retrouvé dans près de 50% des adénocarcinomes bronchiques (16).

Les premières études datant de 2003 (17) (18) s'intéressent à l'utilisation des inhibiteurs de tyrosine kinase dans le traitement de l'adénocarcinome dans des essais de phase II chez des patients en stade IIIb ou IV ayant déjà reçu deux cures de chimiothérapie. Les résultats montrent des baisses de 10 à 15% de la taille de la tumeur. En examinant en détails les résultats, certaines catégories de

population semblent avoir de meilleurs résultats : les femmes, les non-fumeurs, les patients d'origines asiatiques, les patients ayant un adénocarcinome (19).

L'hypothèse d'une variabilité de la cible des EGFR est émise et le séquençage du gène EGFR est alors réalisé (20) (21). Une activation de la fonction phosphorylation du récepteur est plus importante en cas de mutation L858R et de délétion dans l'exon 19 par rapport au phénotype sauvage. En ajoutant l'inhibiteur de tyrosine kinase, l'activation sera freinée plus rapidement et plus efficacement en cas de mutation L858R et de délétion dans l'exon 19 (figures 7 et 8).

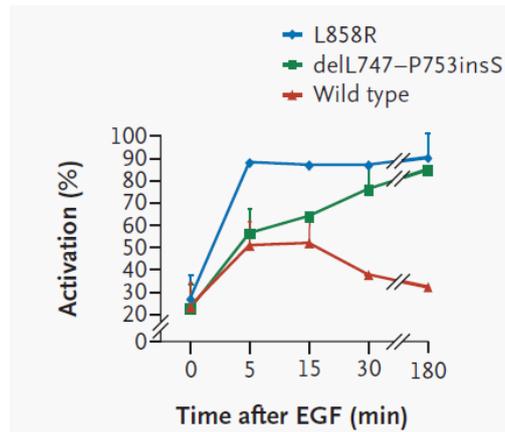


Figure 7 : Pourcentage d'activation d'EGFR en fonction du ligand EGF et du type de mutation dans le tissu tumoral (21)

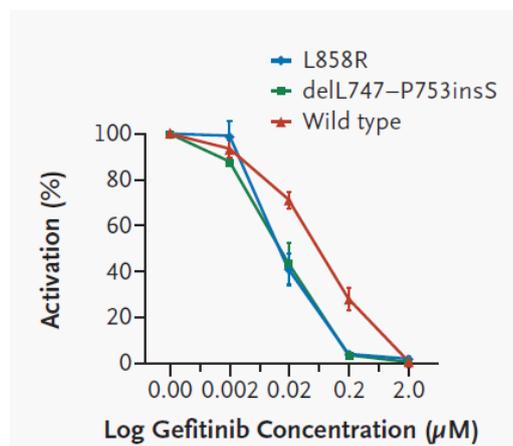


Figure 8 : Pourcentage d'activation d'EGFR en fonction du ligand EGF et du type de mutation en présence d'inhibiteur dans le tissu tumoral (21)

Les mutations somatiques activatrices d'EGFR impliquent l'ATP (adénosine triphosphate) où le site du domaine de la tyrosine kinase intracellulaire, est aussi le site de liaison des inhibiteurs de tyrosine kinase comme l'erlotinib et le gefitinib.

L'activation du récepteur se fera par sa dimérisation. Le récepteur sera activé de manière non contrôlée en cas de mutations activatrices.

Une méta-analyse en 2009 par Jackman et al. (22), montre un taux de réponse à 67% chez les patients traités par inhibiteur de tyrosine kinase qui présentaient une mutation activatrice du gène EGFR. La survie sans progression était en moyenne de 11.8 mois alors que le taux de réponse chez des patients avec le gène EGFR sauvage n'était que de 5 %, avec une survie sans progression en moyenne inférieure à 4 mois.

En première ou seconde ligne, dans le cadre d'essais de phase II, Morita et al. (23) montre un taux de réponse à 76% chez des patients présentant une mutation activatrice comparé à une réponse à 25 % chez des patients traités par chimiothérapie et une durée médiane sans progression de 9.7 mois.

Une méta-analyse par Paz-Ares et al. (24) montre une survie sans progression plus longue pour les patients traités par inhibiteur de tyrosine kinase de 9.8 mois à 13.2 mois contre 5.9 mois par chimiothérapie. En Espagne, Rosell et al. (25) montre une réponse à 70.2% chez des patients avec mutations activatrices de l'EGFR.

4. TKI : Essai de phase III et AMM

L'étude IPASS (Iressa Pan-Asia Study) par Mok en 2009 (26) est la première grande étude en Asie à évaluer la survie sans progression de deux groupes randomisés, un traité par gefitinib et l'autre par carboplatine. Les résultats montrent une survie meilleure par gefitinib chez les patients mutés EGFR que chez les patients sauvages EGFR (figure 9).

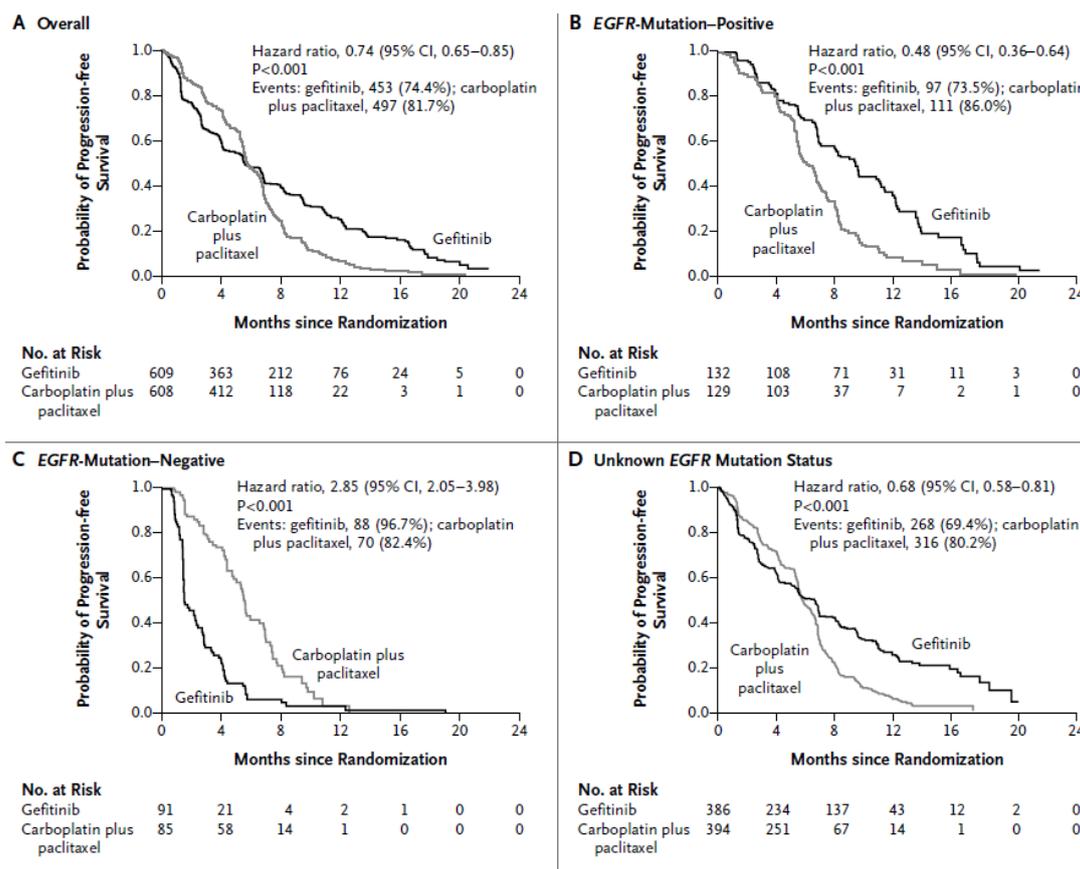


Figure 9 : Courbes de Kaplan Meier des différents sous-groupes comparant les traitements (26)

Groupe A : Ensemble des patients inclus, le groupe traité par gefitinib a une survie plus longue.

Groupe B : Sous-groupes de patients avec anomalie EGFR activatrice, le groupe traité par gefitinib a une survie encore plus importante.

Groupe C : Sous-groupes de patients n’ayant pas d’anomalie d’EGFR activatrice, la survie est plus importante avec la chimiothérapie.

Groupe D : Sous-groupes de patients dont le statut d’EGFR est inconnu, la survie est plus importante avec le gefitinib.

Dans un essai randomisé, multicentrique en phase III Mitsudomi et al. (27), le gefitinib est comparé à l’utilisation de cisplatine associé au docetaxel en traitement de première intention. Sur les 337 patients, seuls ceux présentant une mutation activatrice du gène EGFR (mutation L858R ou délétion de l’exon 19) sont sélectionnés (soit 177 patients), et randomisés. La maladie est évaluée par les critères RECIST. La recherche de mutations du gène EGFR se fait au niveau du tissu tumoral biopsié. La survie sans progression est plus importante dans le groupe traité par gefitinib avec 9.2 mois que par le groupe traité par Cisplatine et Docetaxel avec 6.3 mois (figure 10).

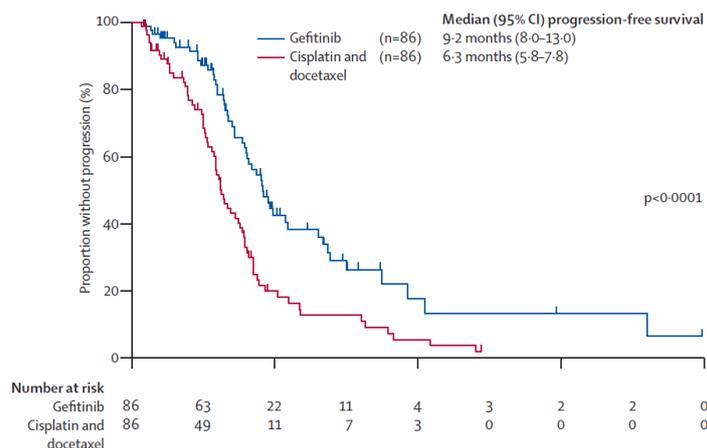


Figure 10 : Survie sans progression entre groupes traités par gefitinib et par Cisplatine associé au docétaxel (27)

Dans l'étude de Cappuzzo et al (28), les patients atteints d'un cancer pulmonaire non à petites cellules reçoivent une chimiothérapie par sels de platine. Les patients qui n'ont pas rechuté sont mis en deux groupes, un groupe traité par erlotinib et l'autre par placebo. La période sans rechute est statistiquement plus longue avec erlotinib avec 12.3 semaines contre 11.1 semaines pour le groupe placebo. Dans les sous-groupes la survie est plus évidente chez des patients présentant une mutation activatrice d'EGFR (figure 11).

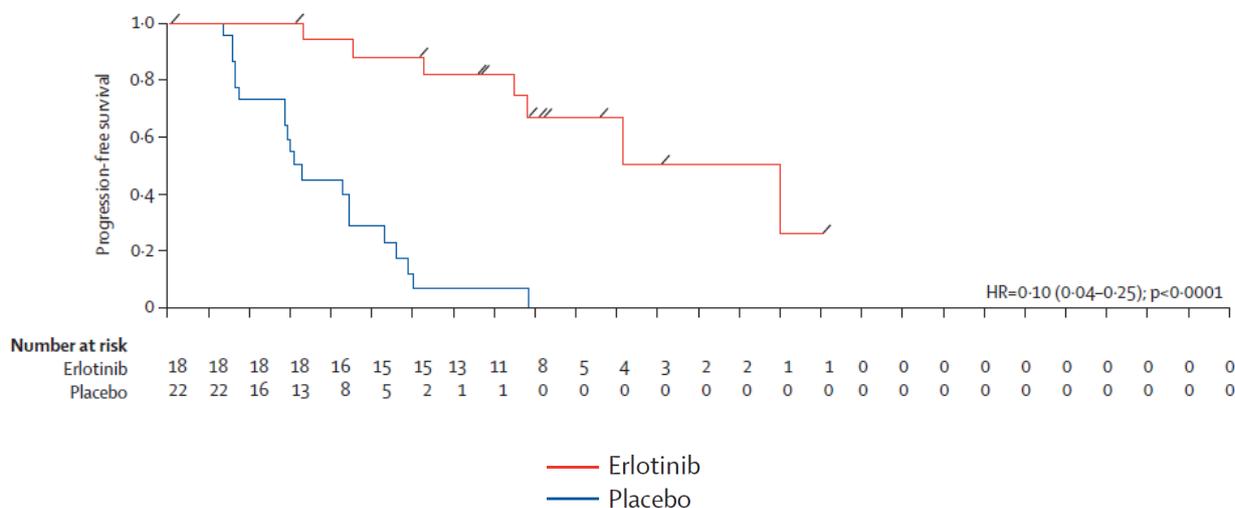


Figure 11 : Survie sans progression entre groupes traités par erlotinib et placebo (28)

Une méta-analyse de cinq études de phase III (29) sur le traitement par inhibiteur de tyrosine kinase, gefitinib ou erlotinib pour le cancer pulmonaire non à petites cellules, montre que les inhibiteurs de tyrosine kinase augmentent la survie sans progression avec un hazard ratio à 0.63 comparé à des placebos.

En 2010, Douillard et al. (30) dans un essai de phase III, le taux de réponse pour les patients avec mutations activatrices de EGFR est de 41.1% chez des patients traités par gefitinib contre 21.1% traités par Docetaxel.

En 2014, un essai de phase IV de Douillard et al. (31) montre que chez 106 patients avec mutations de EGFR en première ligne, 69.9% ont une réponse au gefitinib, la survie moyenne sans progression est de 9.7 mois.

5. Effets secondaires du gefitinib et de l'erlotinib

Plus de 50% des patients traités par erlotinib ou gefitinib ont des effets secondaires cutanés (32).

La cause est l'expression d'EGFR au niveau de la peau et surtout au niveau des kératinocytes et des glandes sudoripares (33). Les principaux effets secondaires cutanés sont l'éruption acnéiforme, les télangéctasies, la folliculite (figure 12), l'hyperpigmentation ainsi que le rash cutané (34).



Figure 12 : Photographie d'une folliculite sous erlotinib (35)

Les effets secondaires digestifs sont principalement la diarrhée et dans 6% des cas, elle peut être sévère (36).

En cas d'effets secondaires importants, le traitement peut être arrêté s'il est inefficace, ou la posologie doit être diminuée. Des traitements symptomatiques peuvent être utilisés (tableau 4).

Tableau 4 : Principales toxicités liées aux traitements par inhibiteur de tyrosine kinase (36)

Type de toxicité	Fréquence (%)	Prise en charge
Cutanée (peau)	60	Crème émolliente, topiques, antibiotiques (cyclines), corticoïdes locaux
Cutanée (phanères)	20	Shampoing hypoallergénique. Lotion topique avec dindamycine
Digestif	55	Lopéramide, diosmectite, racécadotril
Autres		Asthénie, perturbation du bilan hépatique, neutropénie, fibrose pulmonaire

6. AMM en France

En 2009, le gefitinib (Iressa[®], Astra-Zeneca) reçoit l'AMM pour le traitement des patients avec une forme localement avancée ou métastatique de cancer du poumon non à petites cellules et dont la tumeur porte une mutation activatrice de l'EGFR.

L'erlotinib (Tarceva[®], Roche) a reçu l'AMM en 2005 pour le traitement en seconde ligne et plus des patients avec une forme localement avancée ou métastatique de cancer du poumon non à petites cellules. En juin 2012, l'erlotinib a l'AMM en première ligne de traitement des formes localement avancées ou métastatiques du cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) chez les patients dont la tumeur présente des mutations activatrices de l'EGFR.

Pour instaurer ces traitements, la recherche de mutations activatrices du gène EGFR doit être réalisée.

7. Inhibiteur de deuxième génération

L'afatinib (Giotrif[®], Boehringer Ingelheim) est un nouvel inhibiteur de tyrosine kinase. Il a reçu l'AMM en février 2014 et ses indications sont les mêmes que le gefitinib et l'erlotinib, le cancer pulmonaire non à petites cellules au stade avancé avec les anomalies activatrices d'EGFR. Son effet a été démontré dans des études de phase III comparé par rapport à une chimiothérapie classique avec une survie sans progression de 11 mois par rapport à 5.6 mois (37). Il a une action irréversible sur le site de la tyrosine kinase se fixant de façon covalente (38).

Il aurait une activité aussi lors de la mutation T790M (39) (40).

Ses effets secondaires seraient identiques à ceux de première génération mais seraient moins intenses (41). L'afatinib peut, en l'absence de preuve le comparant directement aux autres inhibiteurs de tyrosine kinase être un traitement de remplacement (42).

8. Plan cancer et plateformes de biologie moléculaire

En 2006, l'INCa a soutenu la génétique moléculaire grâce à la mise en place de plateforme hospitalière de génétique moléculaire des cancers. Le Plan Cancer en 2010 contribue au financement de ces projets.

L'objectif de l'INCa est alors :

- De créer des plateformes permettant de réaliser les recherches d'altérations génétiques (somatiques) à visée sanitaire
- D'organiser un maillage territorial permettant à tous les patients français de bénéficier de ces tests.

Il existe aujourd'hui 28 plateformes (figure 13), avec au moins une plateforme par région administrative. Les tests sont financés par des enveloppes spécifiques de l'INCa, puis le relai est pris par la DGOS.

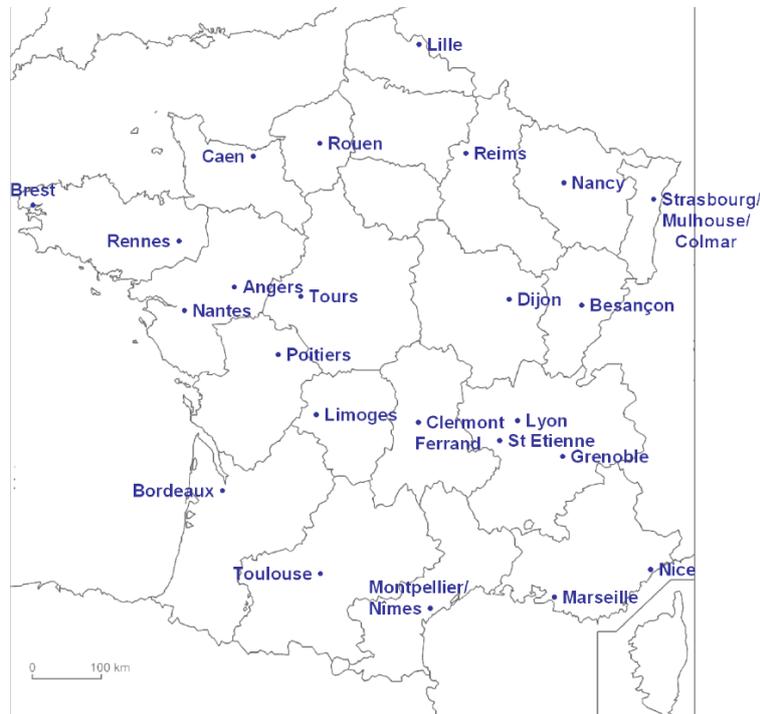


Figure 13 : Carte des plateformes de génétique moléculaire des cancers (1)

9. Techniques de recherche des mutations EGFR dans le tissu biopsié

En 2010 (43), un questionnaire a été envoyé aux 43 laboratoires qui pratiquaient la recherche d'anomalie moléculaire du gène EGFR. Sur les 28 questionnaires retournés, le nombre de patients présentant une anomalie EGFR variait entre 7 et 13%. Différentes techniques sont utilisées. Des techniques comme le séquençage systématique (technique de Sanger), éventuellement précédé d'un criblage per analyse des courbes de fusion à haute résolution. Des techniques un peu plus ciblées comme le pyroséquençage qui permet d'analyser les régions les plus souvent altérées. Des techniques très ciblées, destinés à rechercher spécifiquement des altérations précises.

Les avantages du séquençage des 4 exons sont de détecter toutes les anomalies et même de nouvelles mutations non connues. Les avantages de techniques ciblées comme pour la PCR spécifique d'allèle sont une sensibilité plus importante et une analyse plus rapide (44).

10. Mutation de résistance

En 2005, Kobayashi (45) décrit un patient qui avait une mutation par délétion dans l'exon 19 du gène EGFR puis, ayant reçu un traitement par gefitinib était en rechute. Une nouvelle biopsie est réalisée et le domaine de la tyrosine kinase (exon 18 à exon 21) est séquencé. Une seconde mutation chez ce

patient est identifiée, il s'agit de la T790M sur l'exon 20. La cristallographie montre que cette mutation empêche l'inhibiteur de tyrosine kinase, l'erlotinib d'accéder au site de la tyrosine kinase et donc annule l'inhibition (figure 14).

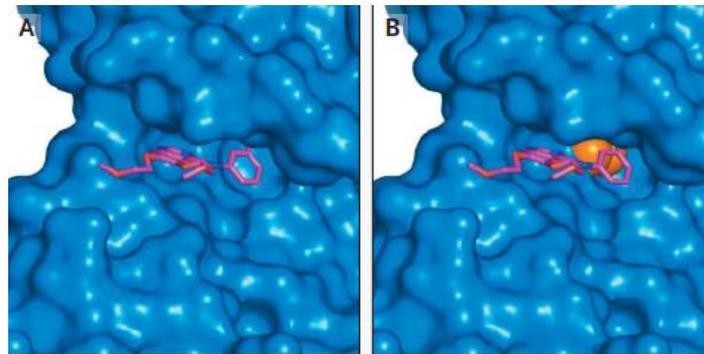


Figure 14 : cristallographie de l'EGFR et interaction avec l'erlotinib (45)

A : erlotinib qui agit sur le site de la tyrosine kinase

B : mutation T790M empêche l'erlotinib d'accéder au site

Cette observation est confirmée par Toyooka (46), en analysant de manière de manière rétrospective les tumeurs et en retrouvant deux patients qui présentaient une mutation L858R mais aussi la mutation T790M. Le traitement s'était avéré inefficace pour un des deux patients traité par gefitinib et le cancer était plus agressif.

In vitro des lignées cellulaires présentant la mutation T790M sont moins sensibles aux inhibiteurs comme le gefitinib (figure 15) (47).

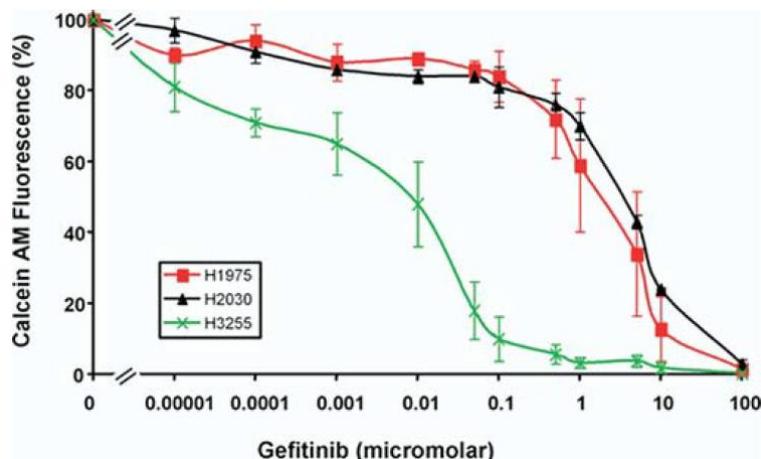


Figure 15 : croissance tumorale en fonction de la concentration en gefitinib (47)

H3255 : lignée avec L858R en vert

H2030 : lignée avec EGFR sauvage en noir

H1975 : lignée avec L858R et T790M en rouge

La mutation de résistance T790M est rare chez les patients dès le diagnostic à l'état naïf. Dans une compilation de 7 études où la mutation T790M était recherchée, elle était retrouvée chez 4 patients sur 845 soit moins de 0.47 % (48).

D'autres études montrent par la suite (49), que la résistance qui est recherchée dans le tissu tumoral chez des patients en rechute est retrouvée dans 50% des cas. Kosaka et al. retrouvent chez 7 patients sur 14 après séquençage des exons 18 à 21 à partir d'une nouvelle biopsie, la mutation T790M (50).

Une autre mutation est incriminée dans la résistance (51), la mutation D716Y sur l'exon 19.

Une fois la mutation de résistance retrouvée, changer d'inhibiteur de tyrosine kinase, passer du gefitinib à l'erlotinib ou l'inverse ne permet pas de retrouver l'efficacité du traitement (52) (53) (54). L'amplification de MET est retrouvée de manière plus fréquente en association avec la résistance T790M (55).

Jackman et al. (56) propose de différencier résistance primaire aux inhibiteur de tyrosine kinase et résistance secondaire. La résistance primaire serait un échec du traitement, se traduisant soit par une stabilité ou soit par une progression de la maladie. La résistance secondaire ou acquise serait due à l'acquisition d'un mécanisme moléculaire permettant l'échappement au traitement. Les critères sont la présence d'une mutation activatrice d'EGFR associée à une sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinase, un traitement par inhibiteur de tyrosine kinase utilisé en monothérapie, une progression de la maladie malgré le traitement par TKI et enfin pas d'utilisation de chimiothérapie.

Dans plus de la moitié des cas (57), l'acquisition de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase est due à l'acquisition de la mutation T790M qui représente plus de 90% des mutations de résistance sur l'EGFR.

Mais d'autres anomalies acquises peuvent provoquer cette résistance comme l'amplification de MET ou de HER2 (figure 16). Bean et al. montre que l'amplification de MET, un proto-oncogène donne un échappement thérapeutique aux patients traités par inhibiteur de tyrosine kinase (58).

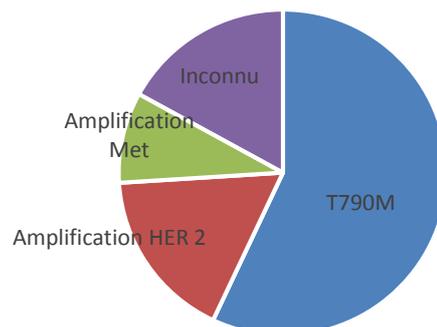


Figure 16 : Diagramme de la répartition des résistances acquises aux inhibiteurs de tyrosine kinase d'après Cortot (57)

11. Inhibiteur de 3^{ème} génération

De nouveaux traitements inhibiteur de tyrosine kinase sont en cours de développement et apportent un espoir pour les patients qui ont une résistance T790M (59). L'AZD9291, agit au niveau du site de la tyrosine kinase et a une affinité plus forte en présence de la mutation T790M (60). Il s'inscrit dans une nouvelle thérapeutique efficace en cas de résistance au traitement par inhibiteur de tyrosine kinase (61).

III. INTERET DE LA QUANTIFICATION DES ADN CIRCULANTS DANS LE CANCER PULMONAIRE NON A PETITES CELLULES

1. Histoire de l'ADN circulant

Les ADN circulants sont découverts en 1948 par Mandel (62). Les ADN circulants d'origine tumorale ont été mis en évidence dès la fin des années 1990 dans les différents cancers.

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

Les mêmes mécanismes sont proposés pour l'ADN circulant d'origine tumorale (figure 17). En plus, il peut être envisagé un passage de cellules tumorales dans la circulation sanguine. Ces cellules seraient ensuite détruites, libérant leur ADN. Une dernière hypothèse suggère un relargage direct d'ADN dans la circulation sanguine par la cellule tumorale (63).

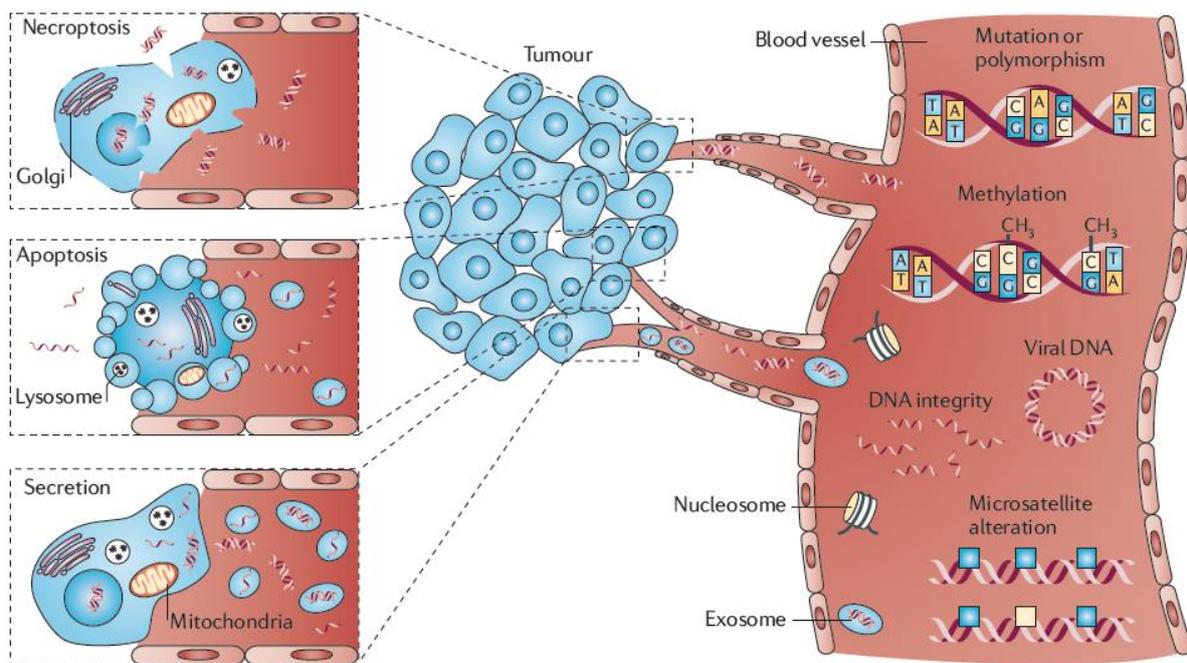


Figure 17 : mécanismes possibles du relargage des ADN circulants d'origine tumorale (64)

Les mécanismes de relargage de l'ADN tumoral dans la circulation sont la destruction de la cellule par apoptose ou nécrose ou le relargage de la cellule tumorale entière dans la circulation. L'ADN tumoral se présentera sous forme de fragments dans la circulation (65).

2. ADN circulant et aspect quantitatif : évaluation pronostique

Une étude avec le gène KRAS chez des souris xénotransplantées avec des cellules tumorales humaines montre que l'ADN sauvage de souris contamine plus l'ADN circulant quand le prélèvement est réalisé sur sérum que sur tube avec anticoagulant EDTA. La concentration en ADN d'origine tumorale est plus importante avec la volume de la tumeur (figure 18) (66).

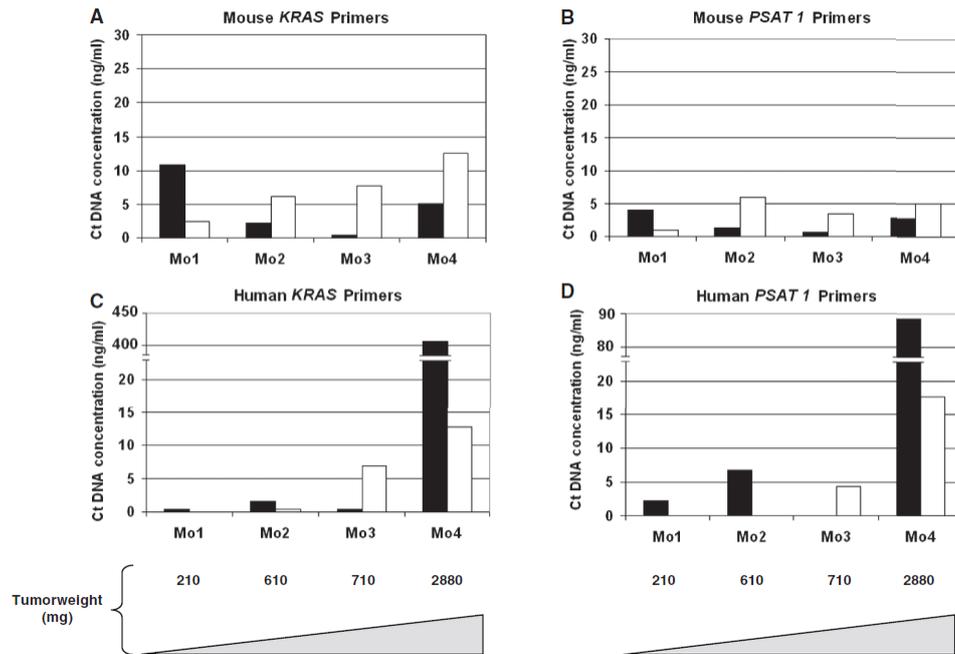


Figure 18 : comparaison d'ADN circulant entre sérum et plasma en fonction de la taille tumorale d'origine humaine (66)

Sérum en blanc et plasma et en noir

Chez l'homme, la concentration en ADN circulant a une valeur pronostic, plus la concentration est importante avant tout traitement plus la survie sera courte (67). La quantification de l'ADN circulant grâce au gène de la β -actine montre une concentration plus élevée chez les patients atteints d'un cancer pulmonaire non à petites cellules par rapport à des patients sains (68). Cette augmentation apparaît des stades précoces de la maladie (figure 19).

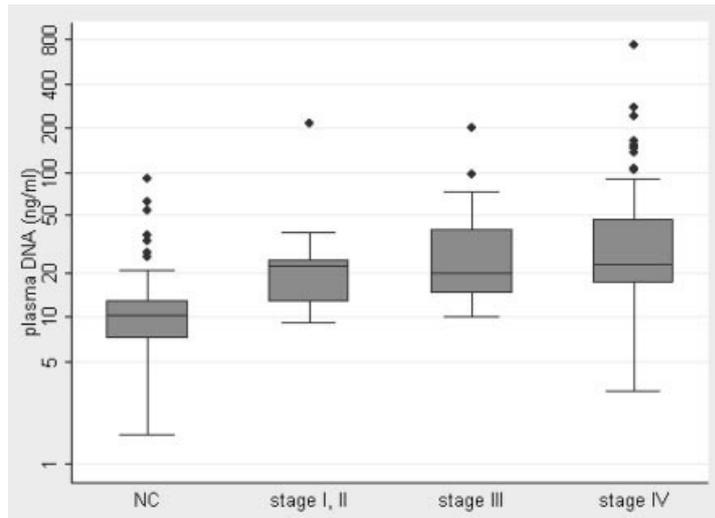


Figure 19 : concentration d'ADN circulant plasmatique à T0 selon les stades de cancer (68)

De nombreuses études montrent une concentration plus élevée d'ADN circulant dans le sérum que dans le plasma chez des sujets atteints de cancer (69). Cette augmentation est due au processus de coagulation dans le tube au moment de la séparation entre le culot globulaire et le sérum. Les globules blancs relâchent ainsi leur ADN et contaminent l'ADN circulant (70). La concentration en ADN (mesurée en quantifiant le gène de la β -Globine) est ainsi plus augmentée dans le sérum de personnes saines que dans leur plasma (figure 20). La conservation à température ambiante augmente cette concentration par rapport à un stockage à +4°C (71)

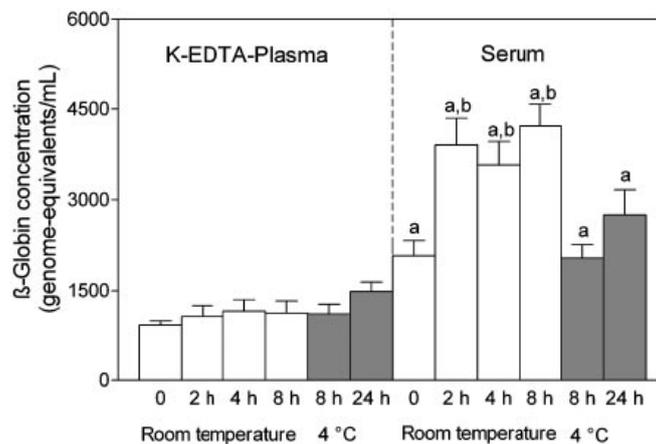


Figure 20 : différence de concentration d'ADN entre plasma et sérum en fonction du temps avant centrifugation (71)

Il existe une grande hétérogénéité sur les méthodes d'extraction, sur les cohortes, et le type de prélèvement sanguin : plasma ou sérum. Le choix du plasma pour étudier l'ADN circulant tumorale est mieux que le sérum afin d'éviter les contaminations par l'ADN des globules blancs au moment de la formation du caillot.

Des efforts de standardisation se mettent en place notamment en 2013 avec El Messaoudi et al. (72). L'héparinate de lithium peut inhiber la réaction de PCR (66) et est déconseillé pour les analyses de biologie moléculaire. L'utilisation comme anticoagulant de EDTA permet une meilleure conservation de l'ADN, la quantification de gène de β -globuline reste stable dans les heures qui séparent le prélèvement et la centrifugation. La contamination par les globules blancs est moindre (figure 21) (73).

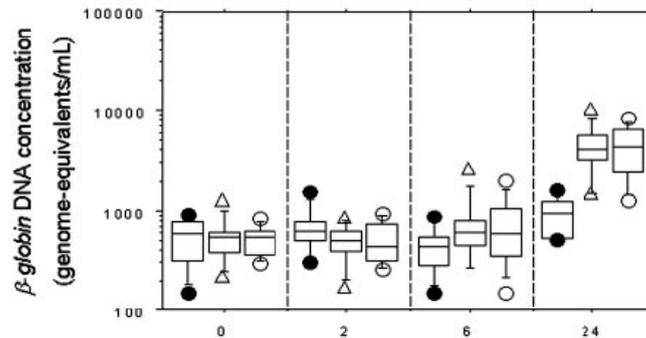


Figure 21 : différence de concentrations d'ADN entre différents anticoagulants (73)

En abscisse, heures après le prélèvement

EDTA en rond plein, héparinate de lithium en triangle, citrate en rond clair.

La séparation entre le culot globulaire et le plasma doit être le plus tôt possible, dès la deuxième heure il y a une augmentation de l'ADN circulant (74). La conservation de l'échantillon avant centrifugation est préférable à +4°C mais n'est pas démontré. La centrifugation doit être faite dans les 4 heures. Après centrifugation il est conseillé de garder le plasma à -20°C ou -80°C, de ne pas décongeler plus de deux fois le plasma (72).

Il n'existe pas de corrélation avec l'âge, le statut tabagique ou le type histologique (75). Par contre la concentration en ADN circulants ne permet de prédire la réponse au traitement (76). La concentration en ADN circulant est plus élevée chez les patients en progression ou stables.

L'étude de patients atteints d'un cancer pulmonaire non à petites cellules a pu mettre en évidence que la concentration en ADN circulants se trouve augmentée par rapport à une population contrôlée (77). Elles peuvent aller de 0 à plus de 1000 ng/mL avec une moyenne à 180 ng/mL chez des patients atteints de cancers pulmonaire contre une moyenne à 30ng/mL chez des sujets contrôlés.

Les fragments d'ADN circulant d'origine tumorale peuvent être utilisés et le pourcentage d'ADN d'origine tumorale peut varier de 10 à 90% selon les échantillons (78). La concentration en ADN circulant mutant ne représente qu'une petite partie de l'ADN circulant total moins de 0.01% (79).

La quantification de l'ADN circulant est déterminée par amplification du gène de cycline D1. Utilisé comme marqueur diagnostique, un seuil à 20 ng/mL d'ADN circulants montre que la probabilité d'avoir un cancer pulmonaire est de 71% quand le test est positif (77) avec une aire sous la courbe ROC de 0.88 (figure 22).

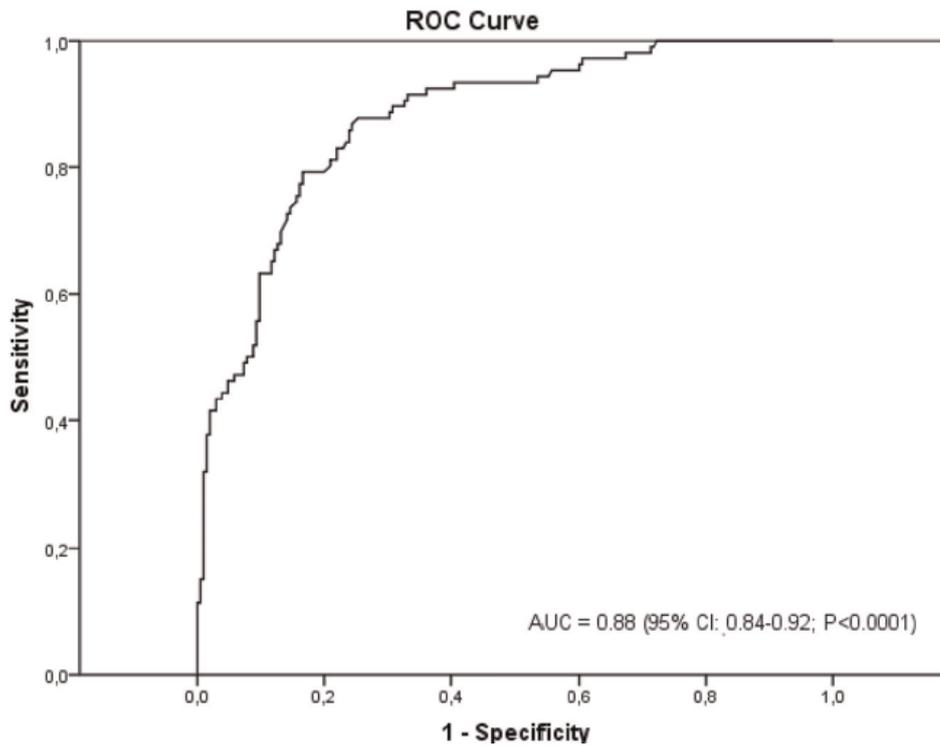


Figure 22 : courbe ROC de la concentration d'ADN circulant pour le pronostic du cancer à 20 ng/mL (77)

Il existe des différences de concentration en ADN tumoral au moment du diagnostic entre les différents stades sur près de 14 types de cancers (figure 23) (80).

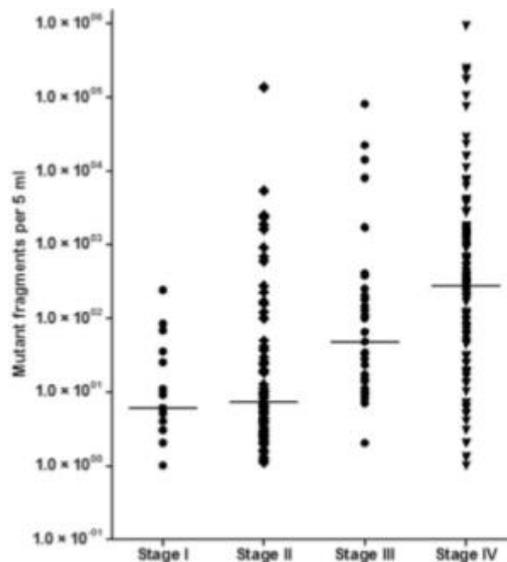


Figure 23 : Concentration d'ADN selon le stade du cancer (80)

Pour le suivi du cancer pulmonaire non à petite cellules aux stades III et IV, l'étude de Sirera et al. (81) utilise la *human telomerase reverse transcriptase* hTERT dosé par PCR dans le plasma pour quantifier l'ADN circulant et le comparer aux variations cliniques. Une concentration faible hTERT à t0 donne un

temps sans progression plus long par rapport à une concentration plus forte. La concentration ne préjuge pas du nombre de métastases et ne peut être utilisé dans le suivi du cancer (figure 24).

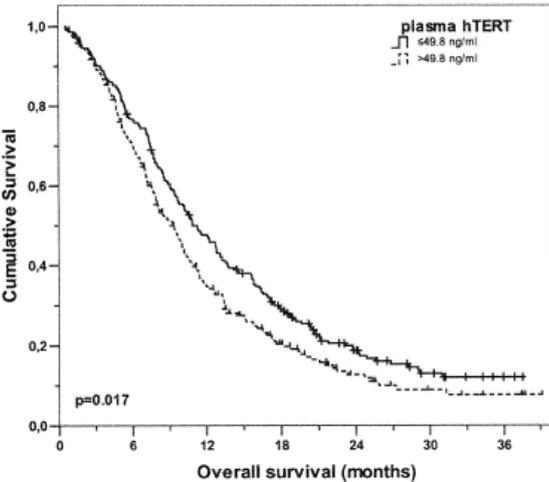


Figure 24 : survie cumulée selon la concentration en ADN circulant avec un seuil à 49.9 ng/mL de hTERT (81)

IV. INTERET DE LA RECHERCHE D'ANOMALIE D'EGFR DANS L'ADN CIRCULANT

1. Avantages par rapport aux biopsies

Aspects techniques et logistiques :

L'un des avantages le plus évident est la faisabilité du prélèvement sanguin, la « biopsie liquide » comparé à la biopsie de tissu. Cette facilité peut permettre de procéder à un suivi tout au long du traitement (75).

Lors de biopsie, la qualité du prélèvement ne permet pas d'avoir assez de tissu tumoral pour avoir des résultats fiables. La concentration en cellules cancéreuses doit souvent dépasser les 10 %.

Enfin le délai d'acheminement du bloc d'inclusion vers le laboratoire de biologie moléculaire peut être trop long par rapport à la prise en charge du patient. Devant une suspicion de masse tumorale, le patient sera adressé à un anesthésiste puis à un radiologue ou à un pneumologue pour réaliser la biopsie qui permettra le diagnostic histologique de cancer. L'anatomo-pathologiste recevra les prélèvements et pourra mettre du temps à répondre à la question posée. Ensuite il adressa le prélèvement au laboratoire de biologie moléculaire. Toutes ces différentes étapes entraînent un délai qui pourra retarder la détection d'anomalies d'EGFR et donc la mise en place d'un traitement adapté. On peut facilement imaginer qu'un prélèvement sanguin parviendra directement donc plus rapidement au laboratoire de biologie moléculaire, et donc devrait pouvoir être analysé plus vite qu'une biopsie.

Hétérogénéité tumorale :

Des variations entre les cellules tumorales peuvent se présenter entre le site de la tumeur et les métastases. Différents clones peuvent métastasier de façon indépendante (figure 25).

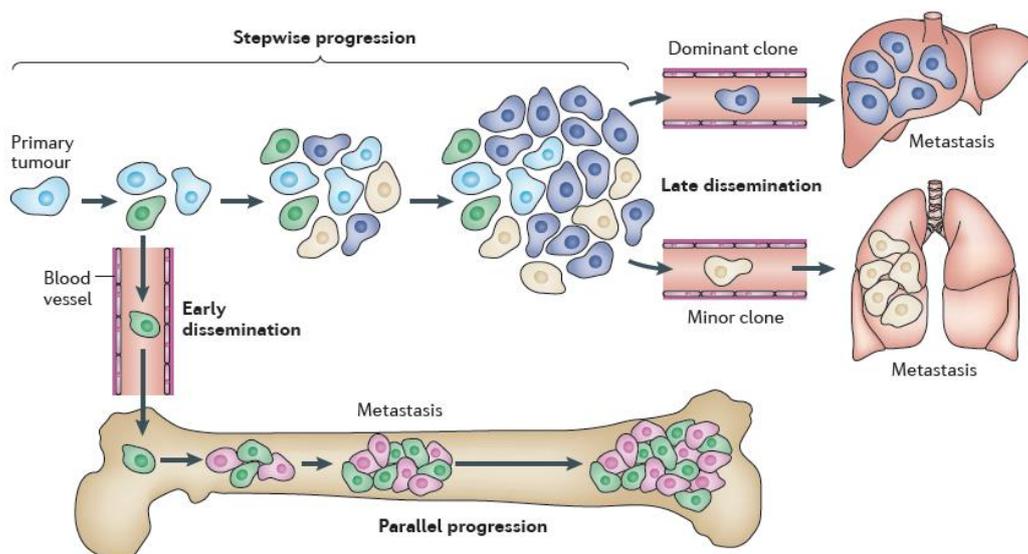


Figure 25 : Modèles expliquant la variation tumorales entre les métastases et la tumeur (82)

La tumeur peut aussi avoir un grand nombre de variations liée à la pression de sélection de l'environnement (figure 26) (82).

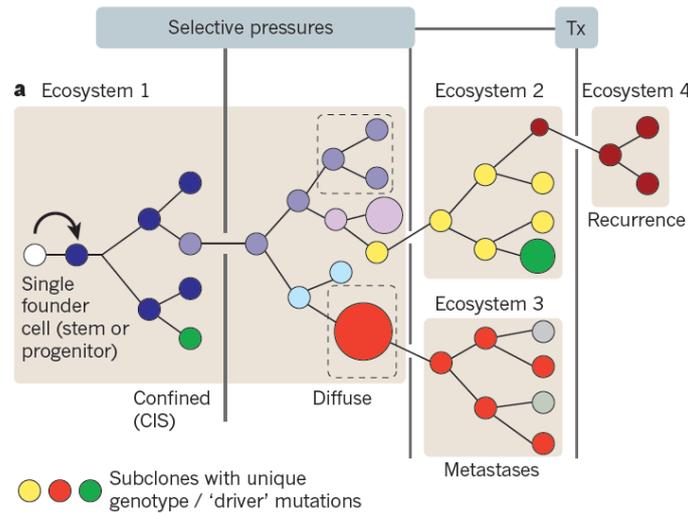


Figure 26 : Evolution des lignées dans les différentes sous populations (83).

La biopsie d'un tissu tumoral et son analyse d'anomalie somatique en biologie moléculaire peut présenter un défaut : le tissu tumoral est hétérogène.

Gerlinger et al. montre (83) que dans le cas d'un cancer du rein métastatiques, différentes biopsies sont réalisées (figure 27) et l'analyse de ces différents fragments montre une anomalie commune la délétion du gène suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau (VHL) dans les 9 biopsies réalisées mais que chaque une des biopsies possède d'autres anomalies acquises au cours du processus de carcinogénèse.

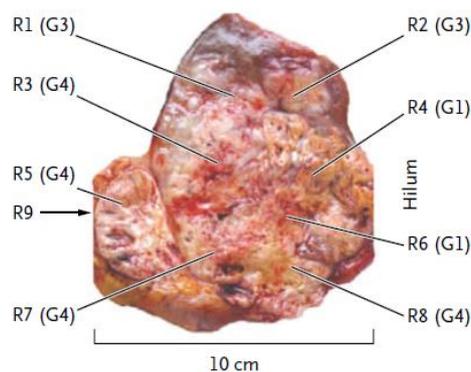


Figure 27 : Biopsies réalisés sur la tumeur (84)

Les auteurs ont établi un lien entre les différentes anomalies et en ont fait un arbre phylogénétique. L'anomalie VHL était la plus précoce puis d'autres anomalies surviennent sur différentes cellules et au final il existe un grand nombre de sous populations tumorales (figure 28). En ne faisant qu'une seule biopsie, près de 67 % des anomalies ne seraient pas retrouvées.

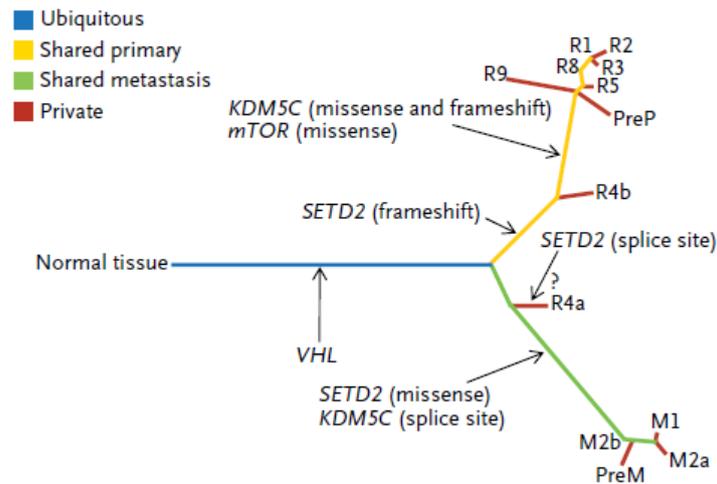


Figure 28 : Arbre phylogénétique des anomalies retrouvées dans les différentes populations biopsiées (84)

2. Intérêt en cancérologie de la recherche d'anomalie dans l'ADN circulant

Pour la détection du gène EGFR dans le sang circulant, l'étude réalisée à Nantes (84) montre que la différence de Ct pour la mutation L858R ou la délétion de l'exon 19 est moindre avec l'utilisation du plasma que du sérum. La diminution de sensibilité avec le sérum est due à la contamination par les globules blancs. Le Ct du contrôle est donc moins élevé ce qui élève le delta entre le Ct contrôle et Ct de la mutation (figure 29). Cette étude montre la faisabilité de rechercher les anomalies spécifiques d'EGFR dans l'ADN circulant.

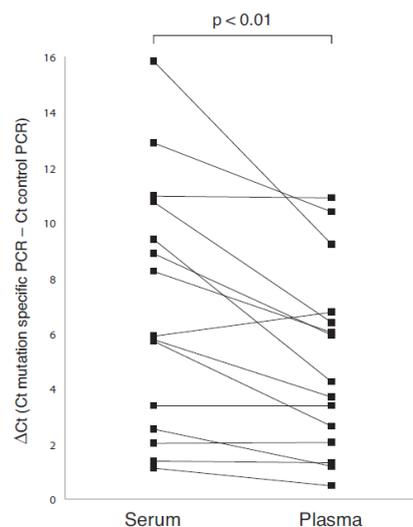


Figure 29 : Comparaison de la différence de Ct obtenu entre sérum et plasma (84)

3. Techniques utilisées pour la recherche d'anomalies d'EGFR

Des études ont cherché des anomalies de l'EGFR au niveau des ADN circulants. Diverses techniques sont utilisées, celle utilisée au CHU de Nantes avec le kit Therascreen® qui utilise le principe de la PCR spécifique d'allèle grâce à la technologie ARMS pour *Scorpion Amplification Refractory Mutation System*. C'est aussi la plus fréquemment utilisée. Ces résultats ont donné une sensibilité et une spécificité à 100 % (85). Les principales études qui ont utilisé cette technique sont celle de Douillard et al. en 2014 (31), celle de Bai en 2012 (86), celle de Goto en 2012 de l'étude IPASS (87).

D'autres techniques sont utilisées comme la DHPLC (*denaturing high performance liquide chromatography*) utilisé par Bai plus tôt en 2009, la PCR digitale par Yung en 2009 (88) et par Oxnard en 2014 (89). Nakumara et al. (90) développe d'une nouvelle méthode d'analyse d'EGFR avec le QP système (*quenching probe system*) pour détection L858R et des délétions de l'exon 19 dans le tissu et le plasma. La technique se fait en 2 étapes : le WIP et le QP (figure 30). Le WIP (*Wild inhibitor Nucleic acid*) séquence complémentaire de la délétion bloque l'amplification chez le type sauvage ; et le QP fait une émission de fluorescence quand il est hybridé. La vérification du fonctionnement de la méthode se fait avec plasmides. Il retrouve 44 % de correspondance avec l'ADN avec les délétions de l'exon 19 par rapport aux biopsies.

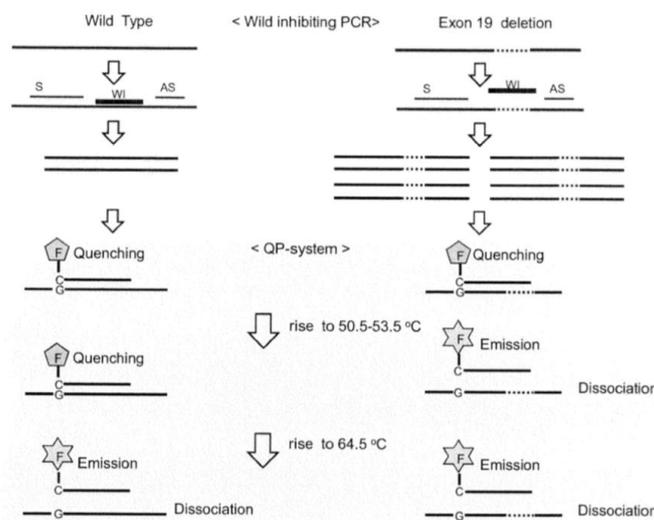


Figure 30 : Technique WIP QP pour la recherche d'anomalie EGFR dans le plasma (91)

De grandes différences existent entre ces techniques. Une méta-analyse (91) s'est efforcée de déterminer les sensibilités et les spécificités de la recherche d'anomalie d'EGFR dans le plasma par rapport à la biopsie (tableau 5). La sensibilité est en moyenne pour tous types de techniques confondues de 0.674 (0.517 - 0.800) et la spécificité de 0.935 (0.888 - 0.963) (tableau 5). La sensibilité est importante, puisque le risque est de ne pas détecter de mutation dans l'ADN circulant alors que l'altération est présente dans la tumeur. Mais la spécificité est probablement plus importante encore,

car retrouver une mutation si elle n'est pas présente dans la tumeur va conduire à la mise en place d'un traitement ciblé dont le patient ne bénéficiera pas.

Tableau 5 : Résultats de la méta-analyse sur les techniques de l'EGFR circulant (92)

ARMS : *Scorpion Amplification Refractory Mutation System*

DHPLC : *denaturing high performance liquide chromatography*

HRM : *high resolution melting*

	Sensibilité	Spécificité
ARMS	0.525 (0.357-0.688)	0.947
DHPLC	0.658 (0.369-0.849)	0.854 (0.783-0.904)
HRM	0.887 (0.402-0.989)	0.736 (0.042-0.994)

En 2014, dans l'essai de phase IV du gefitinib, Douillard et al. (31) montrent que chez 106 patients avec mutations d'EGFR en première ligne, 69.9 % ont une réponse au gefitinib, la survie moyenne sans progression est de 9.7 mois. La recherche d'EGFR dans l'ADN circulant montre une bonne spécificité (99.8 %) (Tableau 6). C'est la plus grosse série actuellement rapportée à ce jour sur l'EGFR circulant dans un essai clinique.

Tableau 6 : Sensibilité et spécificité de la recherche d'EGFR dans le plasma par rapport à la biopsie (31)

Tumour and plasma 1 – screened patients evaluable for both samples (N = 652)					
	Plasma 1 EGFR mutation status (n)				Total
	Positive		Negative		
Adjusted baseline tumour EGFR mutation status, n					
Positive	69		36		105
Negative	1		546		547
Total	70		582		652
	Exon 19 deletions	L858R	L858R and T790M	Negative	Total
Exon 19 deletions	48	0	0	23	71
L858R	0	21	0	12	33
L858R and T790M	0	0	0	1	1
Negative	0	1	0	546	547
Total	48	22	0	582	652
	N		Rate (%)		95% CI
Concordance	652		94.3		92.3–96.0
Sensitivity	105		65.7		55.8–74.7
Specificity	547		99.8		99.0–100.0

4. Intérêt pronostique

Nygaard et al. (92) trouvent pour KRAS muté un marqueur de mauvais pronostic dans le cancer du poumon dans le plasma avec une réduction de l'espérance de vie avec 4.5 mois pour les patients chez qui on retrouve la mutation dans le plasma par rapport à ceux KRAS sauvages avec 9.5 mois.

Rosell et al. en 2012 (93) dans un essai de phase III de l'erlotinib versus une chimiothérapie standard dans deux groupes randomisés dans une population européenne. Il cherche les anomalies de l'EGFR dans le tissu biopsié et dans le sérum. Les anomalies d'EGFR apportent une survie plus importante quand ils sont retrouvés dans sérum du groupe erlotinib avec 10.7 mois par rapport au groupe chimiothérapie 4.2 mois. Le hazard ratio est de 0.25 en faveur de l'erlotinib. Goto dans l'étude IPASS (87) retrouve un hazard ratio à 0.29.

5. Intérêt dans le suivi du traitement

Diaz et al. (94) cherchent dans le suivi du cancer colo-rectal l'intérêt des ADN circulants. Ce modèle permet de voir la pression exercée par le traitement par anticorps monoclonal anti EGFR fait disparaître la concentration en mutations du gène APC présent dans la tumeur au moment du diagnostic. Puis un échappement du traitement et dans la biopsie liquidienne le gène KRAS se trouve muté et une amplification de MET est détecté alors qu'ils étaient sauvage sur la biopsie tissulaire (figure 31). La recherche en continu des mutants dans le sang peut prévenir des échappements au traitement.

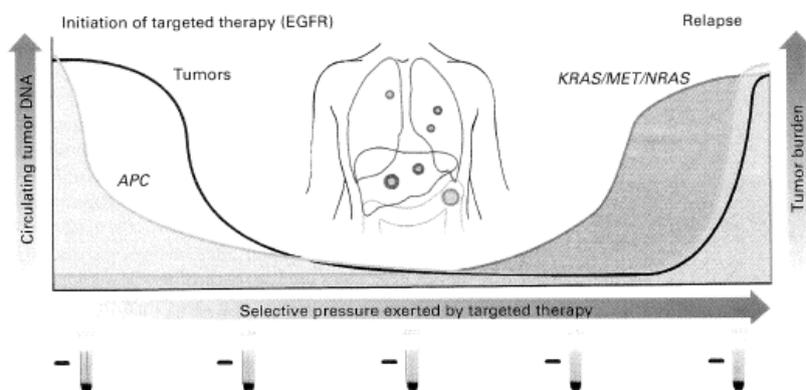


Figure 31 : Détection du gène APC muté et du gène KRAS dans le suivi du traitement du cancer colo-rectal (94)

La diminution tumorale est corrélée à la disparition de la mutation APC dans le sang. Une augmentation et la présence de KRAS muté intervient après progression tumorale

Punnoose et al. (95) présente une série de 41 patients chez qui ils ont évalué le suivi de patients traités et ont mis en évidence une diminution de la masse tumorale évaluée par PET TDM et la décroissance des cellules tumorales circulantes.

L'équipe de Nantes cherche à monitorer EGFR dans l'ADN circulant au cours d'un traitement par inhibiteur de tyrosine kinase dans un case report en 2014 (96). Dans le premier cas, on voit la

disparition de la délétion dans l'exon 19 dans l'ADN circulant en même temps que la régression de la maladie au scanner. La progression de la maladie correspond à la réapparition de la délétion 19 dans le sang. Dans le deuxième cas, on voit une disparition de la mutation L858R avec régression tumorale puis dans deuxième temps l'apparition de la mutation de résistance T790M est concomitante dans un échappement thérapeutique (figure 32).

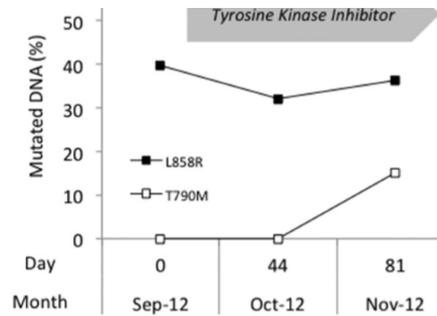


Figure 32 : Suivi des anomalies EGFR dans le plasma.

Nous allons présenter dans la deuxième partie du travail réalisé sur le statut d'EGFR dans l'ADN circulant, un nombre plus important de patients atteints d'un cancer pulmonaire non à petites cellules.

Deuxième partie : travail réalisé

I. MATERIELS ET METHODES

1. Déroulement de l'étude

Les patients inclus dans l'étude ont eu leurs prélèvements entre la période d'août 2012 à fin juillet 2014. Deux centres ont participé à l'étude, le service d'oncologie médicale du centre hospitalo-universitaire de Nantes et le service de pneumologie du centre hospitalier de la Roche sur Yon.

2. Critères d'inclusions

Les patients étaient atteints d'un cancer pulmonaire non à petites cellules présentant une altération d'EGFR (délétion exon 19 ou mutation L858R) dans leur tumeur.

Avant tout traitement, un prélèvement sanguin devait avoir été réalisé pour rechercher les anomalies d'EGFR. Le patient devait être ensuite traité en première intention par inhibiteur sélectif de la tyrosine kinase d'EGFR.

3. Critères d'exclusions

Les raisons d'exclusion de l'étude de certains patients ont été le nombre insuffisant, inférieur à 2, de prélèvements sanguins pour la recherche de mutations activatrices d'EGFR dans le suivi du traitement.

Un traitement par chimiothérapie en première intention excluait le patient.

Une recherche négative dans le plasma à T0 alors que la recherche de mutations était positive dans le tissu biopsié excluait le patient.

4. Recherche de mutations activatrice de l'EGFR : dans le tissu cancéreux

Les patients inclus dans l'étude ont reçu pour le diagnostic de cancer pulmonaire une biopsie avec examen histologique. Les prélèvements ont été reçus et analysés au laboratoire d'anatomo-pathologie qui a affirmé l'origine cancéreuse du prélèvement et qui a recherché l'expression de TTF-1 en immunohistochimie. Les sections ont été coupées dans un bloc de paraffine. Les régions riches en cellules tumorales ont été marquées par l'anatomo-pathologiste par une coloration d'hématoxyline et d'éosine de 3 µm d'épaisseur. Le laboratoire d'anatomo-pathologie a ensuite transmis des lames au laboratoire de biochimie du CHU de Nantes.

La paraffine a été éliminée par immersion des lames dans le toluène (5 minutes), puis de l'éthanol (3 minutes puis 2 minutes).

A l'aide d'un scalpel, la partie la plus riche en cellules tumorales est macrodisséquée et déposée dans une solution contenant de la protéinase K. La lyse dure pendant 12 heures à 56°C.

L'extraction de l'ADN (figure 33) est réalisée à l'aide du kit iPrep® ChargeSwitch Forensic (Invitrogen) sur l'automate iPrep. Le kit utilise des billes magnétiques chargées positivement pour fixer l'ADN qui dans un premier temps sera chargé négativement à pH acide. L'élution se fera à pH basique.

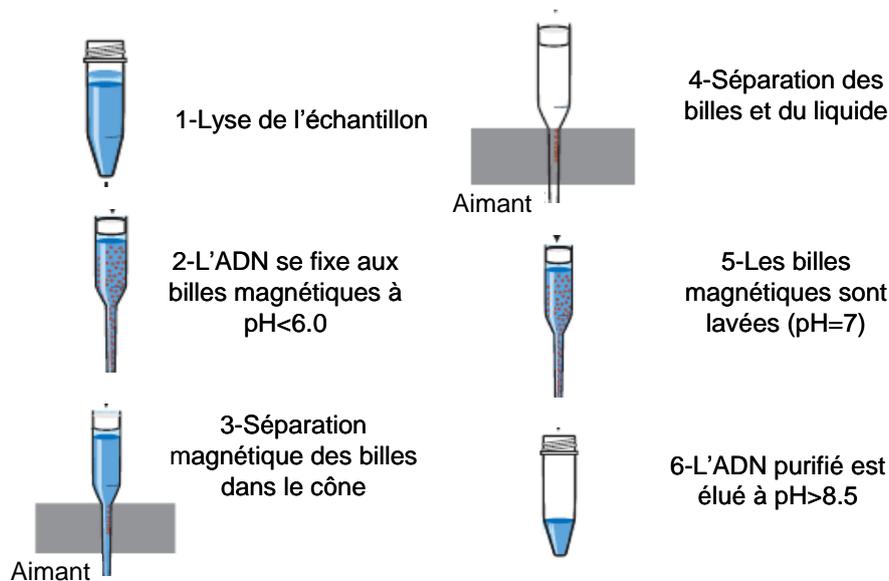


Figure 33 : Etapes de l'extraction de l'ADN sur le kit iPrep

La concentration en ADN est ensuite quantifiée par spectrophotométrie (Nanodrop®) et normalisée à 5 ng/μL avec de l'eau pure. L'extrait d'ADN est conservé à +4°C en attendant l'amplification.

Les recherches ont porté sur les principales mutations activatrices de l'EGFR : la mutation L858R et les délétions de l'exon 19 et la mutation de résistance T790M.

La recherche de la mutation L858R est réalisée par PCR par recherche spécifique d'allèle. Deux amorces nucléotidiques sont utilisées avec des variations en extrémité 3' qui rend spécifique chaque allèle : l'allèle sauvage 858L avec le primer TCAAGATCACAGATTTGGGCT et l'allèle mutant 858R TCAAGATATCACAGATTTGGGCG et un primer commun 21 AS CATCCTCCCCTGCATGTGTTAAAC. On utilise un contrôle négatif avec de l'ADN génomique et un contrôle positif muté L858R. La préparation du mix PCR se fait salle blanche. En pièce pré-PCR on mélange les réactifs. L'amplification est réalisée dans un thermocycleur par RotorGene RQG (Qiagen), avec le mix LC480 SYBR-Green (Roche). Le mix contient 10μL de master mix fourni, 0.5μL de chaque primer et 9μL de l'échantillon. Les conditions du RotorGene étaient pendant 10 minutes à 95°C, puis 45 cycles d'amplification avec une dénaturation pendant 10 secondes à 95°C, une hybridation à 65°C pendant 15 secondes et une amplification à 72°C pendant 20 secondes. Le cycle seuil ou cycle threshold (Ct) était établi pour une intensité de fluorescence de 0.05 unités. La valeur du Ct était déterminée pour le contrôle sauvage 858L et pour le mutant 858R et la différence de Ct (ΔCt) était calculée. Le seuil de Ct pour la recherche positive de la mutation L858R dans le tissu devait être inférieur à 5 (figure 34).

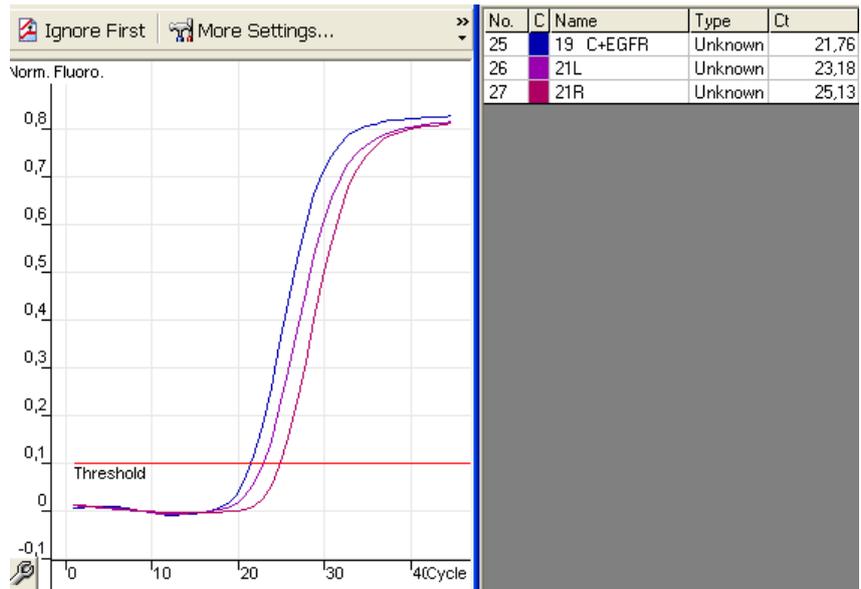


Figure 34 : Exemple de PCR spécifique d'allèle pour la recherche de L858R

Le Ct de la PCR 858L est à 23.18, le Ct de la PCR mutée 21R est à 25.13. Le delta Ct est donc 1.95 soit inférieur à 5. Le tissu présente donc des cellules tumorales avec une mutation L858R

La recherche de délétions de l'exon 19 se faisait par l'analyse de la taille des fragments. Pour la PCR, les amorces nucléotidiques utilisées étaient le 19S GTCTTCCTTCTCTCTGTCATAG et le 19AS CCACACAGCAAAGCAGAACTCAC. Après amplification, les amplicons ont été analysés sur gel de polyacrylamide. La migration avait lieu pendant 1h à 100V. Le fragment sauvage d'EGFR contenait 147 paires de bases. Les délétions de l'exon 19 se traduisaient par des fragments de plus petite taille, migrant plus vite, ainsi que des hétéroduplexes, migrant moins loin (figure 35).

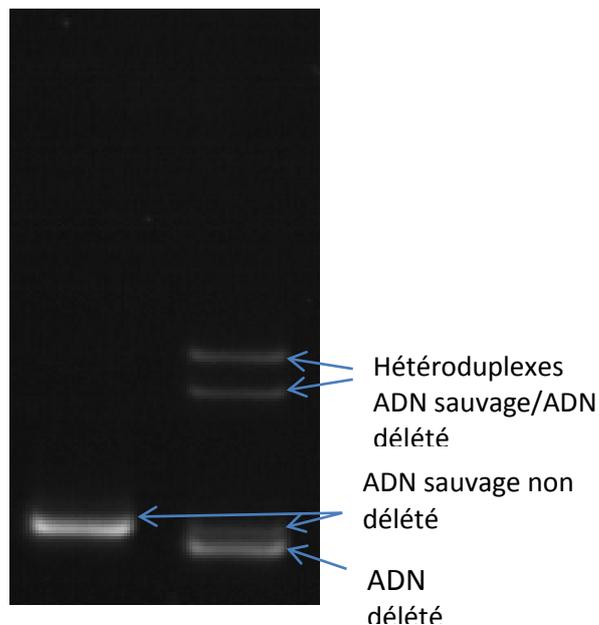


Figure 35 : Gel des fragments amplifiés pour la recherche de délétion de l'exon 19

5. Recherche de mutations activatrice de l'EGFR : dans le plasma

La recherche de mutation de l'EGFR dans le sang, la biopsie liquide, était à demander sur un bon de demande spécifique dans le cadre de notre étude. Seule l'anomalie retrouvée sur la biopsie était recherchée dans le plasma, ainsi que la mutation T790M.

Pour le pré-analytique, le sang devait être récupéré sur EDTA prélevé pendant la consultation, puis adressé au laboratoire pour être centrifugé dans les 4 heures suivant le prélèvement à 2.000 g, pendant 10 minutes.

Le plasma était ensuite congelé dans notre laboratoire à -20°C et conservé à -20°C pour être extrait en série.

L'extraction se faisait sur l'automate iPrep® avec le kit iPrep Purelink virus®. A partir de 400µL de plasma, 20µL ou 40µL d'ADN sont élués.

Le kit Therascreen® EGFR RGQ PCR certifié CE® utilise le principe de la PCR spécifique d'allèle. Il détecte les 29 mutations les plus fréquentes dont 19 délétions de l'exon 19 et la mutation L858R répartis en plusieurs mélanges réactionnels. La mutation de résistance T790M est aussi recherchée.

Mutation	Exon	Changement de base	ID Cosmic
L858R	21	2573T>G	6224
L861Q	21	2582T>A	6213
S768I	20	2303G>T	6241
G719A	18	2156G>C	6239
G719S	18	2155G>A	6252
G719C	18	2155G>T	6253
Insertions	20	2307_2308ins9	12376
		2319_2320insCAC	12377
		2310_2311insGGT	12378
Délétions	19	2235_2249del15	6223
		2235_2252>AAT (complexe)	13551
		2236_2253del18	12728
		2237_2251del15	12678
		2237_2254del18	12367
		2237_2255>T (complexe)	12384
		2236_2250del15	6225
		2238_2255del18	6220
		2238_2248>GC (complexe)	12422
		2238_2252>GCA (complexe)	12419
		2239_2247del9	6218
		2239_2253del15	6254
		2239_2256del18	6255
		2239_2248TTAAGAGAAG>C (complexe)	12382
		2239_2258>CA (complexe)	12387
		2240_2251del12	6210
2240_2257del18	12370		
2240_2254del15	12369		
2239_2251>C (complexe)	12383		

Figure 36 : Anomalies recherchées par le kit Therascreen

Deux technologies sont utilisées dans le kit Therascreen®. La première ARMS, système de mutation réfractaire par amplification, qui possède une Taq ADN polymérase capable de distinguer un appariement parfait d'un mésappariement en 3' des amorces de PCR. En cas d'appariement en 3', l'amplification se fait même si la séquence est minoritaire dans l'échantillon. En cas de mésappariement, une faible amplification se fera en bruit de fond. La seconde technologie est l'utilisation des Scorpions qui sont constitués d'une amorce de PCR liée à une sonde qui contient un fluorophore et un quencher. En cas de liaison entre la sonde et l'amplicon, le fluorophore séparé du quencher émettra une fluorescence plus importante.

Le kit contient aussi un témoin positif, un témoin négatif, un mélange réactionnel test contrôle marqué FAM qui amplifie une région de l'exon 2 non connue pour avoir des mutations. Les autres tests contiennent des sondes Scorpions distinguant ADN sauvage et ADN muté avec un témoin interne marqué HEX. Le témoin interne sert à détecter des inhibiteurs de PCR et doit être positif pour valider la technique.

Les seuils de détections des deltas de Ct sont à 12 pour L858R et les délétions de l'exon 19. Pour la mutation T790M le seuil de détection est un delta de Ct à 8.

Les patients lors de leur entrée dans le protocole d'étude ont signé un consentement faisant état de leur accord pour entreprendre des recherches de mutations somatiques dans leur sang.

6. Méthodologie

Les données cliniques et radiologiques ont été recueillies auprès des cliniciens dans leur dossier clinico-biologique. Les informations cliniques sur l'âge, le sexe, le statut tabagique ont été recueillis.

Les informations de l'anatomo-pathologie avec le type histologique de tumeur et la présence de TTF- 1 réalisé en immuno-histochimie dans les laboratoires d'anatomo-pathologie ont été recueillis.

Les informations scannographiques dans le suivi du patient ont été intégrées et à l'aide des cliniciens et des radiologues, et le score RECIST a pu être établi.

Le type de traitement et la durée a été aussi intégrée.

Lors de la première évaluation, les patients ont eu une deuxième recherche d'anomalie d'EGFR dans le sang ainsi qu'un scanner qui a précédé leur première visite de contrôle.

Tous ces éléments ont été synthétisés pour chaque patient sous forme d'une frise chronologique pour voir l'évolution du patient sous traitement.

Une évaluation au premier temps après le début de traitement puis tout le long du suivi a été faite pour voir l'intérêt du test du statut mutationnel sur l'évolution tumorale sur les critères RECIST.

Un test de Fisher a été réalisé pour comparer à la première évaluation les résultats obtenus pour la recherche d'anomalie d'EGFR et le statut au scanner.

II. RESULTATS

1. Caractéristiques des patients

Dans le cadre de l'étude, 12 patients ont été suivis. Les caractéristiques de ces patients sont notées dans le tableau 7

Tableau 7 : Caractéristiques des 12 patients étudiés

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
Age	82	63	55	74	59	74
Sexe	F	F	F	M	M	F
Fumeur	NON	NON	NON	NON	Fumeur	NON
Hôpital	LRY	LRY	LRY	LRY	LRY	LRY
Histologie	adénocarcinome TTF1+					
TNM	T1N2M1	T4NxM1	T4N2M1	T2N3M1	T2N2M1	T4N3M1
Stade	Stade IV					
Métastases	Os	Os	Poumon, Foie	Plèvre	Cerveau	Cerveau, Surrénale, Plèvre
Traitement	Iressa	Tarceva	Tarceva	Tarceva	Iressa	Iressa
Anomalie	L858R	Del19	L858R	L858R	Del19	Del19

	Patient 7	Patient 8	Patient 9	Patient 10	Patient 11	Patient 12
Age	74	64	79	76	46	66
Sexe	M	M	F	F	F	F
Fumeur	NON	NON	NON	NON	NON	Fumeur
Hôpital	LRY	Nantes	Nantes	Nantes	Nantes	LRY
Histologie	adénocarcinome TTF1+	adénocarcinome TTF1+	Adénocarcinome TTF1+	adénocarcinome TTF1+	adénocarcinome TTF1+	adénocarcinome TTF1+
TNM	T3N2M1	T2N1M1	T4N2M1	T2N3M1	T1N1M1	T2N2M1
Stade	Stade IV	Stade IV	Stade IV	Stade IV	Stade IV	Stade IV
Métastases	Poumon, Surrénale	Pleurésie Vessie	Pleurésie, surrénales cérébrales	Foie, Os	Plèvre	Cerveau
Traitement	Iressa	Tarceva	Iressa	Iressa	Tarceva	Iressa
Anomalie	Del19	Del19	Del19	Del19	L858R	Del19

La moyenne d'âge était de 67,7 ans, 8 patients étaient de sexe féminin, 4 masculins. Sur les 12 patients seuls deux avaient été fumeurs. Huit patients ont été suivis au Centre Hospitalier de la Roche sur Yon, quatre au Centre Hospitalo-Universitaire de Nantes.

L'analyse histologique avait rapporté pour tous les patients un adénocarcinome TTF-1 positif. Au moment du diagnostic les patients étaient au stade métastatique avec un stade IV.

Pour 8 patients, la mutation initiale retrouvée dans la biopsie était la délétion de l'exon 19, pour 4 patients la mutation L858R. Les patients pour 7 d'entre eux ont été traités par Iressa, 5 par Tarceva en 1^{ère} intention (figure 37).

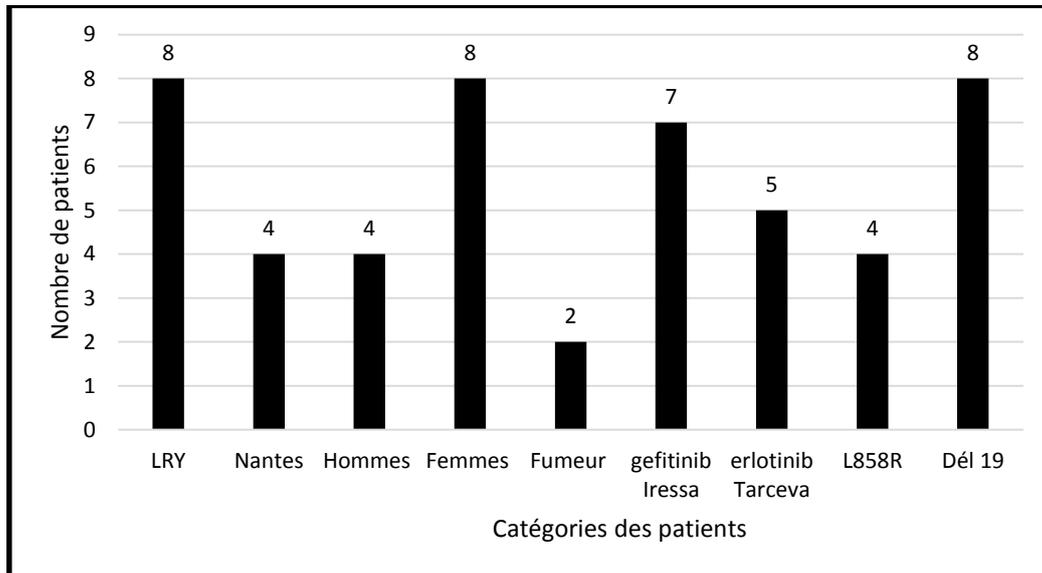


Figure 37 : Répartition des patients selon leurs caractéristiques

Pour la première évaluation après l'instauration du traitement, le scanner pour 7 patients montre une réponse partielle avec plus de 30% de réduction de la masse tumorale selon les critères RECIST. Trois patients avaient une réponse stable, deux avec une progression de la maladie avec augmentation de 20% de la masse tumorale ou de 5mm en valeur absolue.

2. Altérations du gène EGFR dans l'ADN plasmatique et réponse initiale au traitement

Le premier objectif était de déterminer s'il existait un lien entre la réponse clinique et le résultat du premier test moléculaire réalisé.

Pour neuf patients, la première évaluation moléculaire a été faite à 1 mois après le début du traitement (tableau 8)

Tableau 8: Patients dont l'ADN plasmatique a été testé après 1 mois de traitement

Patient n°	Anomalie EGFR	Evolution TDM
1	Négatif	Progression
2	Négatif	Réponse partielle
4	Positif	Réponse stable
5	Négatif	Réponse stable
6	Positif	Progression
8	Négatif	Réponse partielle
9	Négatif	Réponse stable
11	Négatif	Réponse partielle
12	Négatif	Réponse partielle

Deux patients ont eu leur premier prélèvement sanguin 2 mois après le début du traitement (tableau 9)

Tableau 9 : Patients dont l'ADN plasmatique a été testé après 2 mois de traitement

Patient n°	Anomalie EGFR	Evolution TDM
3	Positif	RS
7	Négatif	RP

Enfin, un patient a eu sa première évaluation plus tardivement, 4 mois après le début du traitement (tableau 10)

Tableau 10 : Patient dont l'ADN plasmatique a été testé après 4 mois de traitement

Patient n°	Anomalie EGFR	Evolution TDM
10	Positif	RP

La recherche d'anomalie d'EGFR au cours de la première évaluation (soit lors leur du deuxième prélèvement sanguin) a été positive chez 4 patients (4/12 ; 33.3 %). Parmi les 6 patients répondeurs, 1 seul présentait une mutation dans le plasma (1/6 ; 16.7 %), alors que dans le groupe des malades stables ou progressseurs, la mutation activatrice d'EGFR était retrouvée chez 3 patients (3/6; 50 %) (Tableau 11).

Il n'existe pas de différence significative entre les groupes répondeurs et le groupe stable ou progressseur ($p= 0.54$) par rapport au statut mutationnel d'après le test exact de Fisher.

Tableau 11 : recherche d'anomalie dans le plasma à la première évaluation selon la progression de la maladie

1ere évaluation	PCR Négative	PCR Positive
TDM RP	5	1
TDM RS ou PP	3	3

3. Apparition de la mutation de résistance T790M

Sur les 12 patients, 4 patients ont présenté la mutation de résistance T790M dans le plasma. Le patient 1 au bout de 16 mois de traitement par gefitinib, le patient 2 au bout de 14 mois de traitement par erlotinib puis 4 mois de chimiothérapie, le patient 5 après 13 mois de traitement par gefitinib et enfin le patient 6 avant le traitement par gefitinib.

Le patient 2 qui avait la mutation T790M à 18 mois et était traité par chimiothérapie a eu une disparition de la mutation lors du prélèvement à 24mois.

4. Suivi longitudinal des patients pendant le traitement

Les 12 patients ont fait l'objet de recherches d'altérations dans l'ADN circulant pendant leur traitement. Ces histoires étant toutes différentes, chaque patient est présenté indépendamment des autres.

Le patient 5 présentait une délétion dans l'exon 19. Il fût traité par gefitinib. A M3, la délétion disparaît et la réponse reste stable (diminution de 22%). La réponse à M6 était partielle, la délétion n'était toujours pas détectée. A M13 apparaissait la délétion ainsi que la mutation T790M. Le patient était en progression de la maladie. La mutation n'était pas retrouvée un mois plus tard. Le gefitinib fût arrêté pour une corticothérapie. La masse tumorale diminue rapidement. Le patient décédera d'une pneumopathie infectieuse.

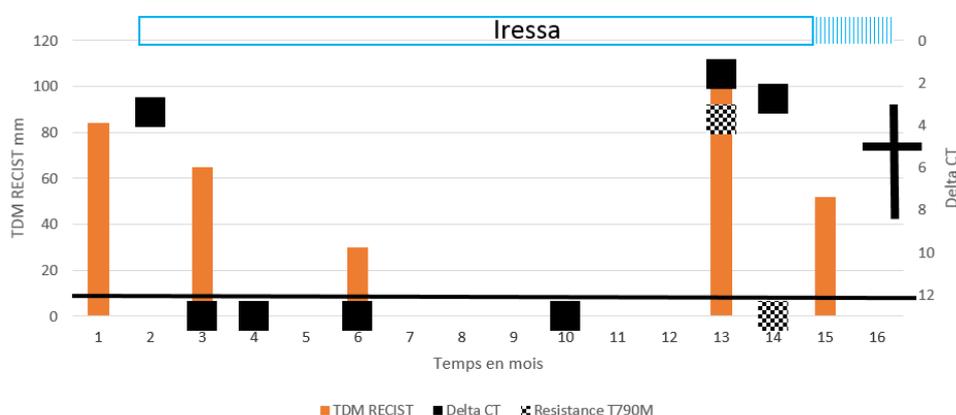


Figure 38 : évolution du patient 5

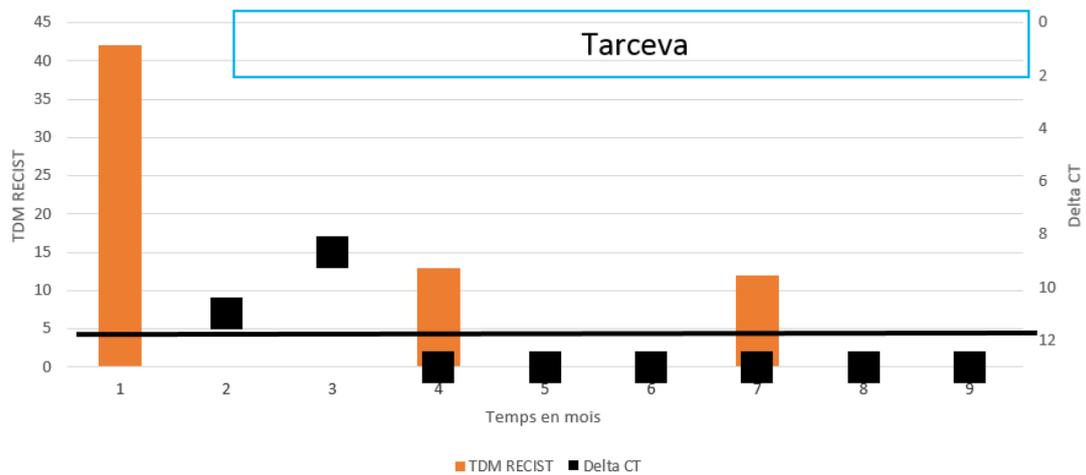


Figure 39 : évolution du patient 8

Le patient 8 présentait une délétion dans l'exon 19. Il fût traité par erlotinib. A M3 la délétion était encore présente. A M4 la délétion disparaît et la maladie est en réponse partielle. La maladie reste stable à M7 et la délétion n'est plus détectée.

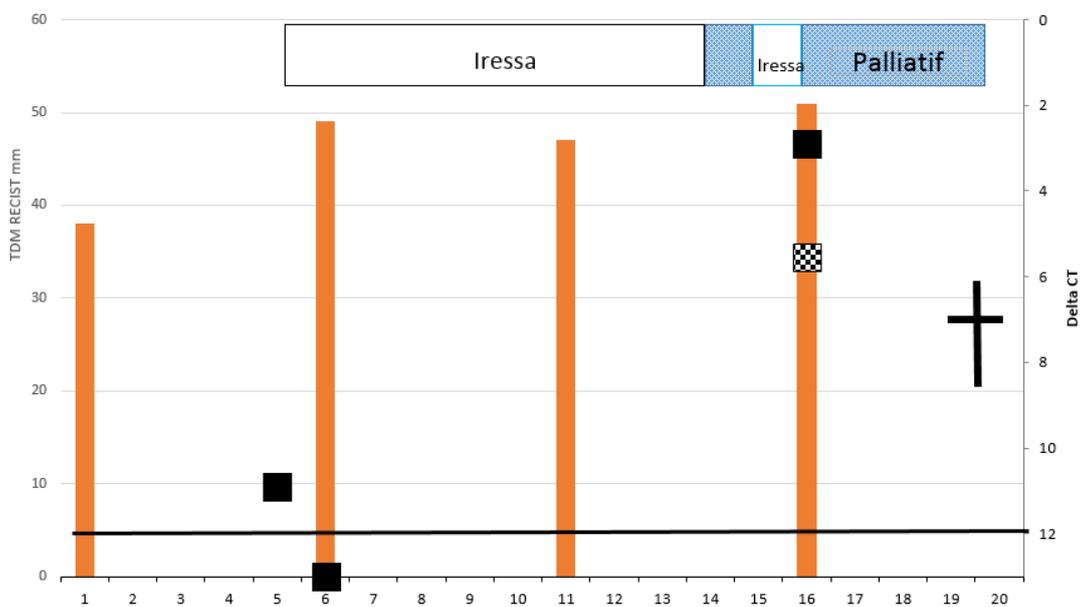


Figure 40 : évolution du patient 1

Le patient avait une mutation L858R dans la biopsie et dans le plasma à M5 qui disparaît à M6 soit 1 mois après l'instauration du traitement par gefitinib. Le gefitinib est arrêté 1 mois devant une embolie pulmonaire. Le score RECIST restait stable et à M16 la mutation L858R était présente à nouveau avec l'apparition d'une deuxième mutation, la T790M mutation de résistance. Le traitement par gefitinib était arrêté pour des soins de confort et le patient décéda à M20.

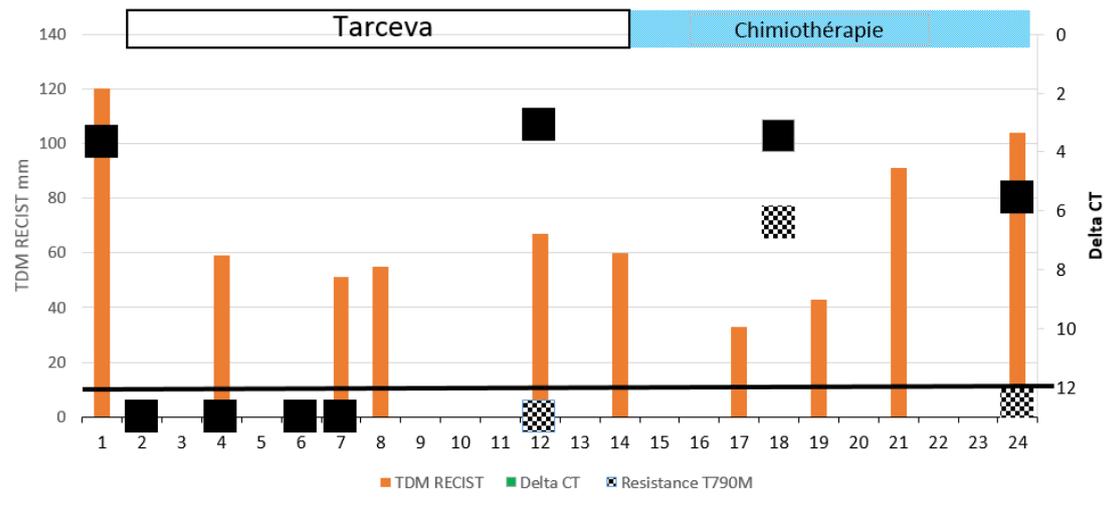


Figure 41 : évolution du patient 2

Le patient 2 présentait une délétion dans l'exon 19 qui est retrouvé dans le plasma à T0. Il fût traité par erlotinib et la délétion disparaît dans le plasma à M4 avec une réponse partielle au traitement d'après les critères RECIST. La délétion réapparaît à M12 avec un score RECIST stable. Le traitement par erlotinib est stoppé à M14 et remplacé par radiothérapie et chimiothérapie par Gemzar. Une deuxième réponse partielle a lieu entre M14 et M17. La délétion restait présente à M18 avec l'apparition de la mutation de résistance T790M. La progression tumorale a lieu entre M19 et M24. La délétion restait présente à M24, la T790M disparaissait sur ce même prélèvement.

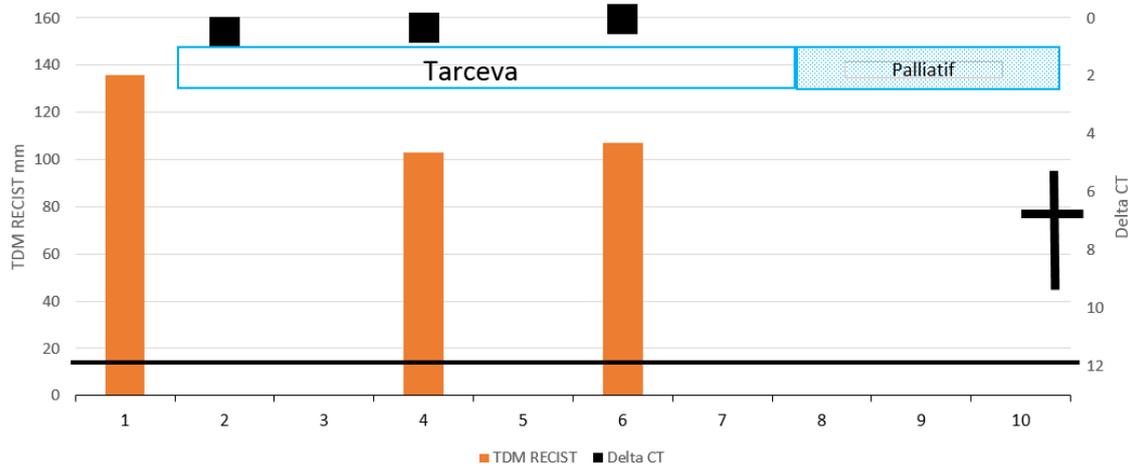


Figure 42 : évolution du patient 3

Le patient 3 est présentait une mutation L858R et fût traité par erlotinib. La mutation restait présente entre M2 et M6 avec une stabilité de la tumeur (diminution de 24% entre M1 et M4). Le traitement par erlotinib est arrêté à M8 pour des soins de confort et le patient décède à M10.

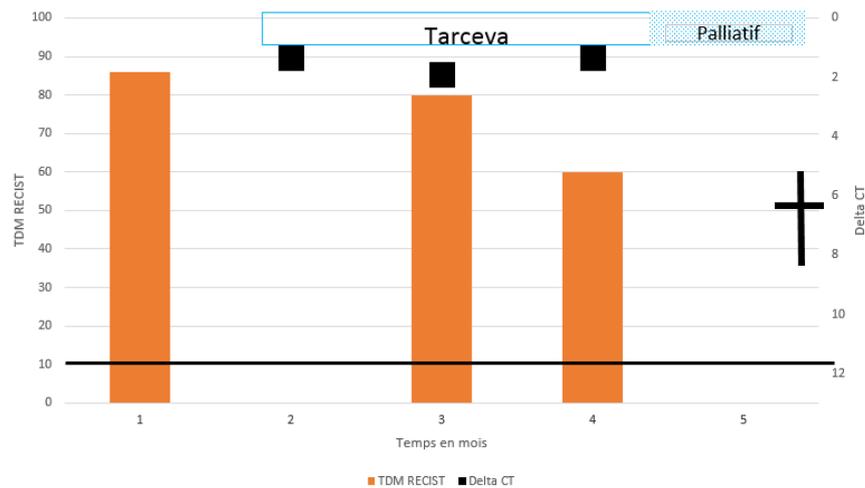


Figure 43 : évolution du patient 4

Le patient 4 présentait une mutation L858R et fût traité par erlotinib. La mutation persistait à M4 sur 2 autres prélèvements. Entre M3 et M4 la maladie restait stable (diminution de 25%). Le traitement par erlotinib fût arrêté à M4 pour des soins de confort et le patient décédera à M5.

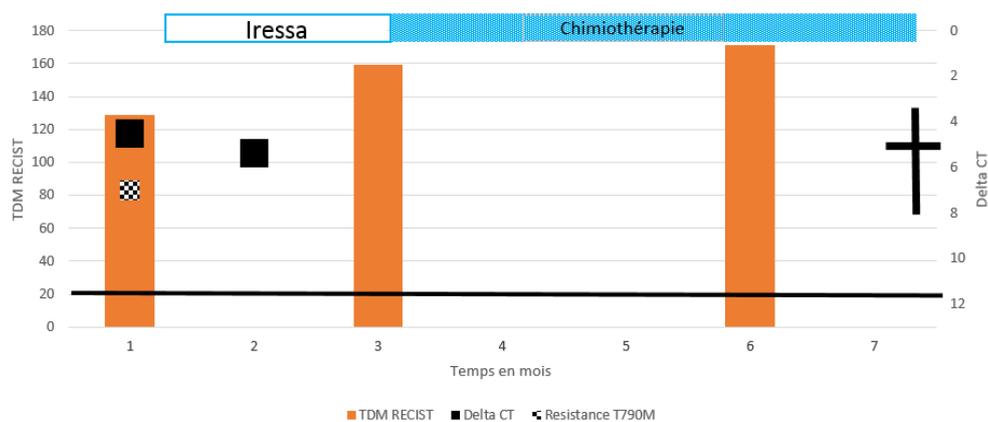


Figure 44: évolution du patient 6

Le patient 6 présentait une délétion dans l'exon 19. Il fût traité par gefitinib. La mutation de résistance absente dans la biopsie était retrouvée à M1 dans le plasma. La délétion ne disparaît pas et la masse tumorale est stable. Le gefitinib est arrêté pour la chimiothérapie. Le patient décédera à M7

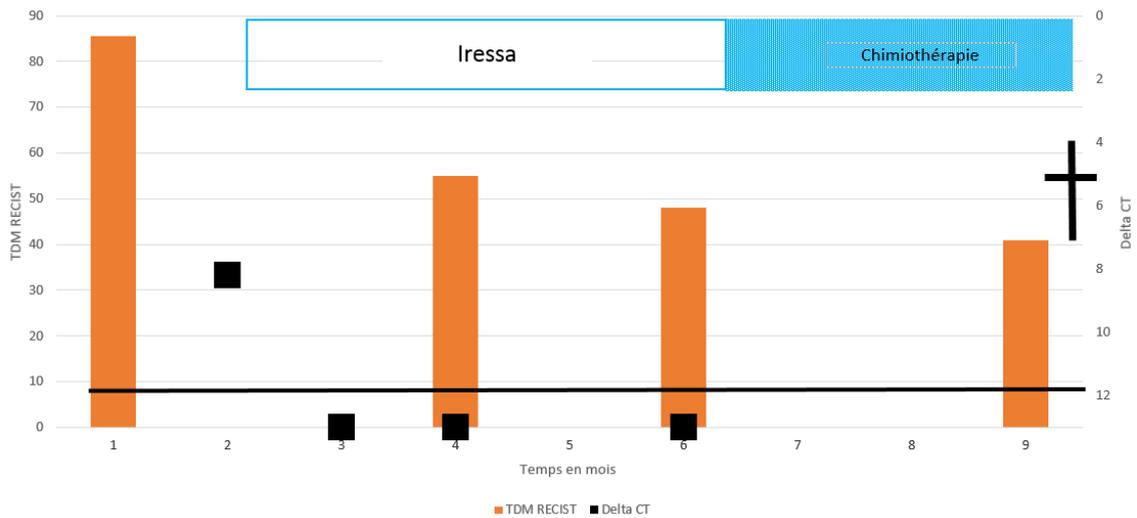


Figure 45 : évolution du patient 7

Le patient 7 présentait une délétion dans l'exon 19. Il fût traité par gefitinib. La délétion disparaît et la maladie est en réponse partielle à M4. A M6 la réponse reste stable, la délétion n'est toujours pas détectable. Le traitement est changé pour une chimiothérapie. Le patient décédera à M9.

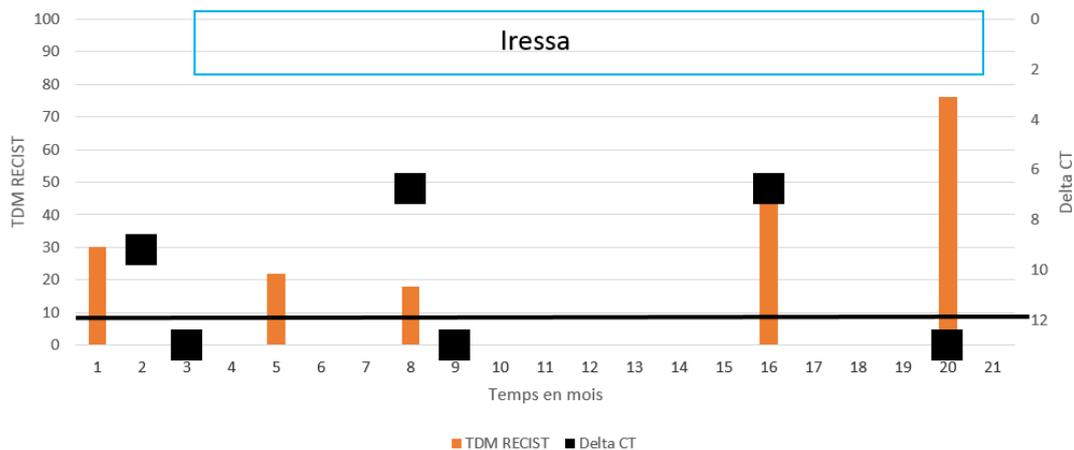


Figure 46 : évolution du patient 9

Le patient 9 présentait une délétion dans l'exon 19. Il fût traité par gefitinib. A M3 la délétion disparaît et la masse tumorale reste stable. A M8 la délétion réapparaît et avec une masse tumorale stable. A M9 elle disparaît. A M16, la maladie progresse et la délétion réapparaît. A M20 la délétion disparaît mais la maladie continue à progresser.

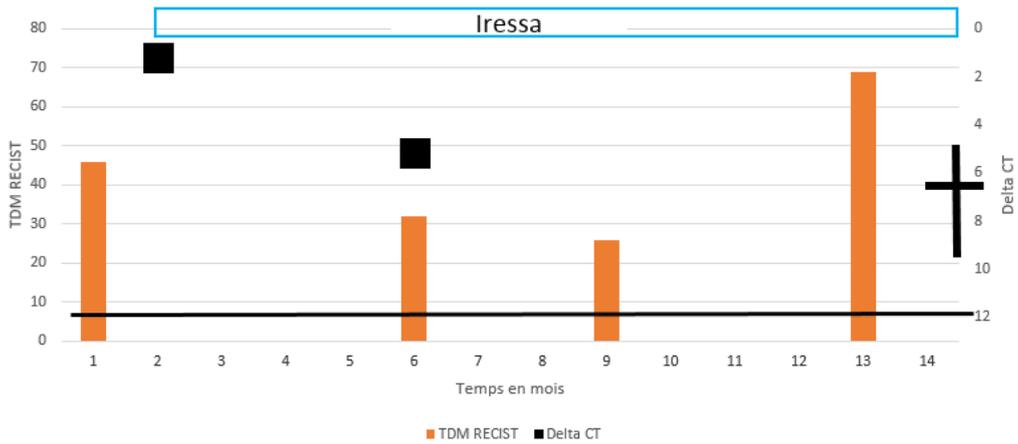


Figure 47 : évolution du patient 10

Le patient 9 présentait une délétion dans l'exon 19. Il fût traité par gefitinib. La délétion reste présente à M6 et la maladie est en réponse partielle. La maladie reste stable à M9 puis progresse à M13 sans qu'on ait de prélèvement. A M14 le patient décèdera.

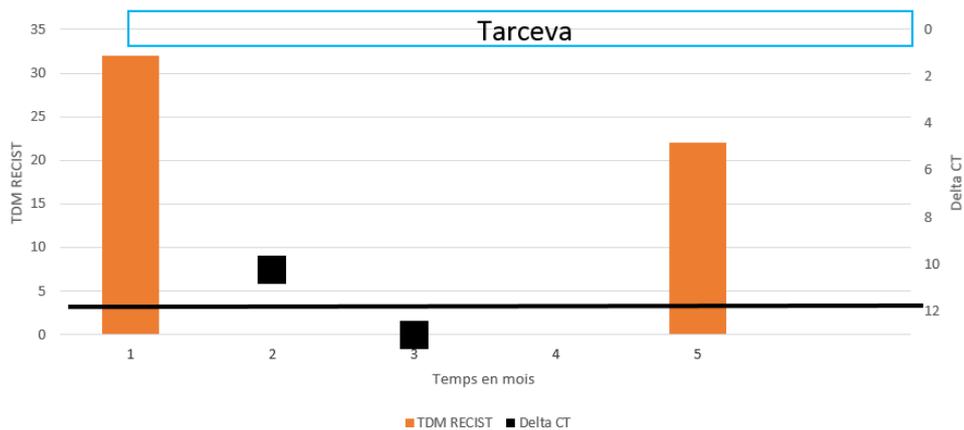


Figure 48 : évolution du patient 11

Le patient 11 présentait une mutation L858R. Il fût traité par erlotinib. La mutation disparaît à M3 et la maladie évaluée à M5 montre une réponse partielle.

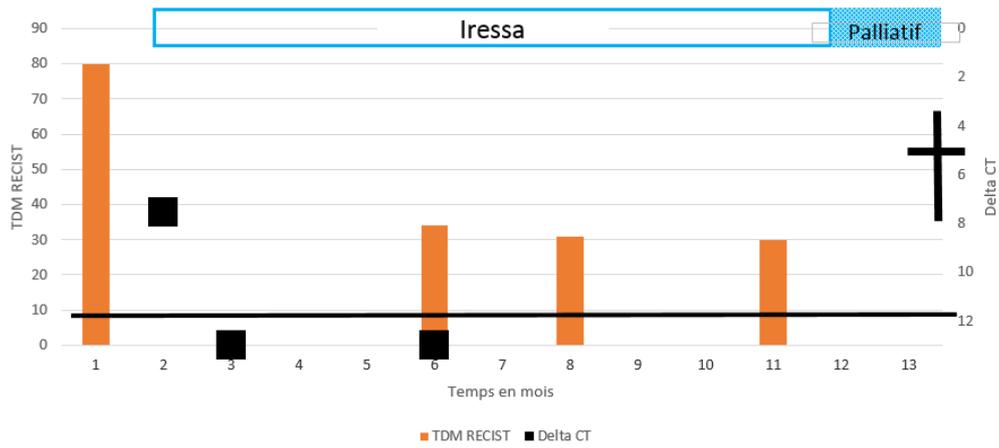


Figure 49 : évolution du patient 12

Le patient présentait une délétion dans l'exon 19. Il fût traité par gefitinib A M3 et M6 la délétion n'est pas retrouvée et l'évaluation de la maladie montre une réponse partielle. La maladie reste stable ensuite, le gefitinib est arrêté à M11 pour des soins de confort et le patient décèdera à M13.

III. DISCUSSION

La découverte des anomalies d'EGFR et des inhibiteurs de tyrosine kinase ont modifié la prise en charge thérapeutique du cancer pulmonaire non à petites cellules. Le traitement du cancer s'est personnalisé et les plateformes de biologie moléculaire sont indispensables pour cette prise en charge (97).

L'ADN circulant utilisé à titre qualitatif comme marqueur de suivi du traitement est encore peu utilisé. Peu d'études ont commencé à évaluer ce nouveau marqueur et celles qui l'ont fait utilisent des techniques différentes avec des sensibilités variées (75). Le kit Therascreen® est souvent utilisé car il est facile d'accès en routine et présente une très bonne sensibilité dans le tissu biopsié (85) et dans le plasma. La méta-analyse de Luo et al. montre aussi ces différentes techniques avec des seuils de sensibilités différentes (91). Des efforts pour dans un premier temps d'homogénéiser le pré-analytique (72) permettent de pouvoir comparer ces différents résultats.

Notre étude s'est portée sur un petit échantillon de patients. La difficulté d'avoir un plus grand nombre de patients est lié au protocole d'avoir un échantillon sanguin au moment du diagnostic. Seuls deux centres ont suivi ce protocole, le CH de la Roche sur Yon et le CHU de Nantes. Une autre difficulté était d'avoir des prélèvements sanguins à des temps différents d'un patient à un autre. Aucun protocole n'était établie et la consultation se faisait selon l'état du patient, ce qui peut être un biais. Notre groupe est donc assez hétérogène.

Chez certains patients il existe une corrélation entre le statut mutationnel et l'évolution de la maladie. Les patients 2, 5, 7, 8, 11 et 12 ont une disparition de l'anomalie d'EGFR dans le plasma associée à une réponse partielle objectivée sur la masse tumorale.

Pour les patients 3, 4, 6 l'anomalie EGFR reste présente dans le plasma et la masse tumorale reste stable. Pour les patients 8 et 12 dans un deuxième temps, la tumeur est stable ou en progression et l'anomalie EGFR réapparaît dans le plasma. La détection précoce de l'anomalie dans le plasma pourrait nous anticiper un échec du traitement.

Par contre chez les 3 derniers patients, les patients 1, 9 et 10 la corrélation entre le statut EGFR et la réponse au traitement est moins évidente. Le patient 1 a la mutation L858R qui disparaît dans le plasma alors que la réponse au traitement est stable. Il manque peut être un point entre la disparition de la mutation et la réapparition dans le plasma. Le patient 9 a la délétion de l'exon 19 qui disparaît puis réapparaît dans le plasma sans lien évident avec l'évolution de la masse tumorale. Le patient 10 a dans un premier une réponse partielle au traitement mais la délétion de l'exon 19 reste présente. Un point supplémentaire nous aurait peut être donné plus d'informations entre le nadir de la masse tumorale et la progression qui a précédé son décès.

Ces exemples soulignent la difficulté à obtenir des résultats objectifs pour conclure au statut d'EGFR dans le plasma dans le suivi du cancer pulmonaire non à petites cellules traités par inhibiteur de tyrosine kinase. Des cohortes plus importantes sont à mettre en place avec des protocoles bien établis.

La mutation de résistance au traitement par inhibiteur de tyrosine kinase a été détecté chez les patients 1, 5 et 6 pendant le traitement par inhbiteur de tyrosine kinase et qui ont eu leur traitement rapidement arrêté devant l'inefficacité de ce dernier. Le patient 5 qui était déjà sous chimiothérapie au moment de l'apparition de la mutation T790M n'a plus été traité par inhibiteur de tyrosine kinase. La détection dans le plasma de la mutation T790M permettrait d'arrêter le traitement et de le changer pour une chimiothérapie. Les inhibiteurs de 3^{ème} génération pourraient être utilisés et avec la meilleure affinité qu'ils ont en présence de T790M, l'efficacité anti-tumorale serait plus importante (59).

Cependant l'échappement aux inhibiteurs de tyrosine kinase n'est pas toujours expliqué par l'apparition de la mutation T790M comme c'est le cas pour les patients 3, 4, 6 et 9. D'autres anomalies sur d'autres gènes peuvent expliquer l'échappement du traitement (57). Ces anomalies ne sont pas encore étudiées sur l'ADN circulant en routine et les développer pour prévenir les rechutes.

Les biopsies liquides représentent des avantages par rapport à la biopsie tissulaire car elles sont faciles à réaliser, elles sont faciles à répéter et le résultat est rendu rapidement. Elles s'abrogent de l'hétérogénéité des biopsies tumorales.

Cette étude nous apporte des tendances sur le rôle que pourrait avoir le statut d'EGFR. Marqueur de suivi d'un traitement par inhibiteur de tyrosine kinase, il pourrait nous renseigner précocement sur l'évolution tumorale. La détection précoce dans le plasma de la mutation T790M peut inciter le clinicien à arrêter plus rapidement le traitement par inhibiteur de tyrosine kinase. Des études avec des effectifs plus importants, un protocole plus structuré et plus homogène et sur une période plus longue pourraient répondre à ces tendances.

Bibliographie

1. INCa. Mutations de l'EGFR dans le cancer du poumon : mise en évidence d'une cible moléculaire permettant un accès spécifique aux thérapies ciblées - Publications - Institut National Du Cancer [Internet]. 2010 [cité 1 sept 2014]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/publications/71-soins/554-mutations-de-legfr-dans-le-cancer-du-poumon-mise-en-evidence-dune-cible-moleculaire-permettant-un-acces-specifique-aux-therapies-ciblees>
2. Lantuéjoul S, Salameire D, Brambilla E. Classification histologique des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules. *Rev Mal Respir Actual*. sept 2011;3(4):295-301.
3. Travis WD, Travis LB, Devesa SS. Lung cancer. *Cancer*. 1 janv 1995;75(1 Suppl):191-202.
4. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. févr 2011;6(2):244-85.
5. Wirth N, Bohadana A, Spinosa A, Martinet Y. Les pathologies respiratoires liées au tabagisme passif. *Rev Mal Respir*. juin 2009;26(6):667-78.
6. Quoix E, Lemarié E. Épidémiologie du cancer bronchique primitif : aspects classiques et nouveautés. *Rev Mal Respir*. oct 2011;28(8):1048-58.
7. Han B, Gfroerer JC, Colliver JD. Associations between duration of illicit drug use and health conditions: results from the 2005-2007 national surveys on drug use and health. *Ann Epidemiol*. avr 2010;20(4):289-97.
8. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. août 2007;2(8):706-14.
9. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. janv 2009;45(2):228-47.
10. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. sept 2001;37 Suppl 4:S3-8.
11. Peters S, Betticher DC. [The role of EGFR in non-small cell lung carcinoma]. *Rev Médicale Suisse*. 20 mai 2009;5(204):1096-8, 1100-1.
12. Ciardiello F, Tortora G. EGFR Antagonists in Cancer Treatment. *N Engl J Med*. 13 mars 2008;358(11):1160-74.
13. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 31 juill 2014;511(7511):543-50.

14. Masui H, Kawamoto T, Sato JD, Wolf B, Sato G, Mendelsohn J. Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res.* mars 1984;44(3):1002-7.
15. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer.* mars 2007;7(3):169-81.
16. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1 juill 1995;19(3):183-232.
17. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard J-Y, et al. Multi-Institutional Randomized Phase II Trial of Gefitinib for Previously Treated Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 15 juin 2003;21(12):2237-46.
18. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: A randomized trial. *JAMA.* 22 oct 2003;290(16):2149-58.
19. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, et al. Erlotinib in Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 14 juill 2005;353(2):123-32.
20. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* 4 juin 2004;304(5676):1497-500.
21. 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.
22. Jackman DM, Miller VA, Cioffredi L-A, Yeap BY, Jänne PA, Riely GJ, et al. Impact of Epidermal Growth Factor Receptor and KRAS Mutations on Clinical Outcomes in Previously Untreated Non-Small Cell Lung Cancer Patients: Results of an Online Tumor Registry of Clinical Trials. *Clin Cancer Res.* 15 août 2009;15(16):5267-73.
23. Morita S, Okamoto I, Kobayashi K, Yamazaki K, Asahina H, Inoue A, et al. Combined survival analysis of prospective clinical trials of gefitinib for non-small cell lung cancer with EGFR mutations. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 juill 2009;15(13):4493-8.
24. Paz-Ares L, Soulières D, Melezínek I, Moecks J, Keil L, Mok T, et al. Clinical outcomes in non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations: pooled analysis. *J Cell Mol Med.* janv 2010;14(1-2):51-69.
25. Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med.* 3 sept 2009;361(10):958-67.
26. Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, Yang C-H, Chu D-T, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 3 sept 2009;361(10):947-57.
27. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* févr 2010;11(2):121-8.

28. Cappuzzo F, Ciuleanu T, Stelmakh L, Cicenás S, Szczésna A, Juhász E, et al. Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol.* juin 2010;11(6):521-9.
29. Chen X, Liu Y, Røe OD, Qian Y, Guo R, Zhu L, et al. Gefitinib or Erlotinib as Maintenance Therapy in Patients with Advanced Stage Non-Small Cell Lung Cancer: A Systematic Review. *PLoS ONE.* 21 mars 2013;8(3):e59314.
30. Douillard J-Y, Shepherd FA, Hirsh V, Mok T, Socinski MA, Gervais R, et al. Molecular Predictors of Outcome With Gefitinib and Docetaxel in Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer: Data From the Randomized Phase III INTEREST Trial. *J Clin Oncol.* 2 oct 2010;28(5):744-52.
31. Douillard J-Y, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, McCormack R, Webster A, et al. First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *Br J Cancer.* 7 janv 2014;110(1):55-62.
32. Ricciardi S, Tomao S, de Marinis F. Toxicity of targeted therapy in non-small-cell lung cancer management. *Clin Lung Cancer.* janv 2009;10(1):28-35.
33. Agero ALC, Dusza SW, Benvenuto-Andrade C, Busam KJ, Myskowski P, Halpern AC. Dermatologic side effects associated with the epidermal growth factor receptor inhibitors. *J Am Acad Dermatol.* oct 2006;55(4):657-70.
34. Pérez-Soler R, Delord JP, Halpern A, Kelly K, Krueger J, Sureda BM, et al. HER1/EGFR inhibitor-associated rash: future directions for management and investigation outcomes from the HER1/EGFR inhibitor rash management forum. *The Oncologist.* mai 2005;10(5):345-56.
35. Robert C, Soria J-C, Spatz A, Le Cesne A, Malka D, Pautier P, et al. Cutaneous side-effects of kinase inhibitors and blocking antibodies. *Lancet Oncol.* juill 2005;6(7):491-500.
36. Castel M, Pathak A, Despas F, Mazières J. [Adverse effects of new biological therapies for non-small-cell bronchial cancer]. *Presse Médicale Paris Fr* 1983. avr 2011;40(4 Pt 1):415-9.
37. Wu Y-L, Zhou C, Hu C-P, Feng J, Lu S, Huang Y, et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* févr 2014;15(2):213-22.
38. Prim N, Fore M, Menecier B. L'afatinib (BIBW 2992). *Rev Pneumol Clin [Internet].* [cité 21 sept 2014]; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0761841714000479>
39. Li D, Ambrogio L, Shimamura T, Kubo S, Takahashi M, Chirieac L, et al. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene.* 7 août 2008;27(34):4702-11.
40. Kwak EL, Sordella R, Bell DW, Godin-Heymann N, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24 mai 2005;102(21):7665-70.
41. Yang JC-H, Hirsh V, Schuler M, Yamamoto N, O'Byrne KJ, Mok TSK, et al. Symptom control and quality of life in LUX-Lung 3: a phase III study of afatinib or cisplatin/pemetrexed in patients with advanced lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 sept 2013;31(27):3342-50.

42. Popat S, Mok T, Yang JC-H, Wu Y-L, Lungershausen J, Stammberger U, et al. Afatinib in the treatment of EGFR mutation-positive NSCLC--a network meta-analysis. *Lung Cancer Amst Neth.* août 2014;85(2):230-8.
43. Denis M-G. [Searching for EGFR: current practices]. *Rev Pneumol Clin.* juin 2011;67 Suppl 1:S5-8.
44. Ellison G, Zhu G, Moulis A, Dearden S, Speake G, McCormack R. EGFR mutation testing in lung cancer: a review of available methods and their use for analysis of tumour tissue and cytology samples. *J Clin Pathol.* févr 2013;66(2):79-89.
45. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, et al. EGFR Mutation and Resistance of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N Engl J Med.* 24 févr 2005;352(8):786-92.
46. Toyooka S, Kiura K, Mitsudomi T. EGFR mutation and response of lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 19 mai 2005;352(20):2136; author reply 2136.
47. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, et al. Acquired Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib Is Associated with a Second Mutation in the EGFR Kinase Domain. *PLoS Med.* 22 févr 2005;2(3):e73.
48. Ma C, Wei S, Song Y. T790M and acquired resistance of EGFR TKI: a literature review of clinical reports. *J Thorac Dis.* mars 2011;3(1):10-8.
49. Costa DB, Nguyen K-SH, Cho BC, Sequist LV, Jackman DM, Riely GJ, et al. Effects of erlotinib in EGFR mutated non-small cell lung cancers with resistance to gefitinib. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 nov 2008;14(21):7060-7.
50. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Yoshida K, Hida T, Tsuboi M, et al. Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 oct 2006;12(19):5764-9.
51. Balak MN, Gong Y, Riely GJ, Somwar R, Li AR, Zakowski MF, et al. Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 nov 2006;12(21):6494-501.
52. Costa DB, Schumer ST, Tenen DG, Kobayashi S. Differential responses to erlotinib in epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutated lung cancers with acquired resistance to gefitinib carrying the L747S or T790M secondary mutations. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 mars 2008;26(7):1182-4; author reply 1184-6.
53. Viswanathan A, Pillot G, Govindan R. Lack of response to erlotinib after progression on gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth.* déc 2005;50(3):417-8.
54. Garfield D. Lack of response to erlotinib after progression on gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth.* juin 2006;52(3):373.
55. Turke AB, Zejnullahu K, Wu Y-L, Song Y, Dias-Santagata D, Lifshits E, et al. Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer Cell.* 19 janv 2010;17(1):77-88.

56. Jackman D, Pao W, Riely GJ, Engelman JA, Kris MG, Jänne PA, et al. Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 janv 2010;28(2):357-60.
57. Cortot AB, Jänne PA. Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc*. sept 2014;23(133):356-66.
58. Bean J, Brennan C, Shih J-Y, Riely G, Viale A, Wang L, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 déc 2007;104(52):20932-7.
59. Akkermans R. Third-generation EGFR-TKIs—a new hope for NSCLC. *Lancet Respir Med*. juill 2014;2(7):520.
60. Cross DAE, Ashton SE, Ghiorghiu S, Eberlein C, Nebhan CA, Spitzler PJ, et al. AZD9291, an Irreversible EGFR TKI, Overcomes T790M-Mediated Resistance to EGFR Inhibitors in Lung Cancer. *Cancer Discov*. sept 2014;4(9):1046-61.
61. Rolfo C, Giovannetti E, Hong DS, Bivona T, Raez LE, Bronte G, et al. Novel therapeutic strategies for patients with NSCLC that do not respond to treatment with EGFR inhibitors. *Cancer Treat Rev*. sept 2014;40(8):990-1004.
62. Mandel P. MP. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *Compte Rendu de l'Academie des Sciences* 142:241–243; 1948.
63. Esposito A, Bardelli A, Criscitiello C, Colombo N, Gelao L, Fumagalli L, et al. Monitoring tumor-derived cell-free DNA in patients with solid tumors: clinical perspectives and research opportunities. *Cancer Treat Rev*. juin 2014;40(5):648-55.
64. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. juin 2011;11(6):426-37.
65. 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 Mutat Res*. mai 2007;635(2–3):105-17.
66. Thierry AR, Moulriere F, Gongora C, Ollier J, Robert B, Ychou M, et al. Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Res*. 10 janv 2010;38(18):6159-75.
67. Sozzi G, Conte D, Mariani L, Lo Vullo S, Roz L, Lombardo C, et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res*. 15 juin 2001;61(12):4675-8.
68. Yoon K-A, Park S, Lee SH, Kim JH, Lee JS. Comparison of Circulating Plasma DNA Levels between Lung Cancer Patients and Healthy Controls. *J Mol Diagn JMD*. mai 2009;11(3):182-5.
69. Lee T-H, 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)*. 1 févr 2001;41(2):276-82.

70. Umetani N, Hiramatsu S, Hoon DS b. Higher Amount of Free Circulating DNA in Serum than in Plasma Is Not Mainly Caused by Contaminated Extraneous DNA during Separation. *Ann N Y Acad Sci.* 1 sept 2006;1075(1):299-307.
71. 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.* 6 janv 2003;49(6):1028-9.
72. 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.
73. Lam NYL, Rainer TH, Chiu RWK, Lo YMD. EDTA Is a Better Anticoagulant than Heparin or Citrate for Delayed Blood Processing for Plasma DNA Analysis. *Clin Chem.* 1 janv 2004;50(1):256-7.
74. Xue X, Teare MD, Holen I, Zhu YM, Woll PJ. Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. *Clin Chim Acta.* 27 juin 2009;404(2):100-4.
75. Vallée A. Apports potentiels de l'ADN circulant pour la prise en charge des cancers bronchiques non à petites cellules. *Corresp En Onco-Théranostic.* déc 2013;(3).
76. Kumar S, Guleria R, Singh V, Bharti AC, Mohan A, Das BC. Efficacy of circulating plasma DNA as a diagnostic tool for advanced non-small cell lung cancer and its predictive utility for survival and response to chemotherapy. *Lung Cancer.* nov 2010;70(2):211-7.
77. Catarino R, Coelho A, Araújo A, Gomes M, Nogueira A, Lopes C, et al. Circulating DNA: diagnostic tool and predictive marker for overall survival of NSCLC patients. *PLoS One.* 2012;7(6):e38559.
78. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 15 févr 2001;61(4):1659-65.
79. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8 nov 2005;102(45):16368-73.
80. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 19 févr 2014;6(224):224ra24.
81. Sirera R, Bremnes RM, Cabrera A, Jantus-Lewintre E, Sanmartín E, Blasco A, et al. Circulating DNA is a useful prognostic factor in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* févr 2011;6(2):286-90.
82. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature.* 19 janv 2012;481(7381):306-13.
83. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N Engl J Med.* 7 mars 2012;366(10):883-92.
84. Vallée A, Marcq M, Bizieux A, Kouri CE, Lacroix H, Bennouna J, et al. Plasma is a better source of tumor-derived circulating cell-free DNA than serum for the detection of EGFR alterations in lung tumor patients. *Lung Cancer Amst Neth.* nov 2013;82(2):373-4.

85. Vallée A, Le Loupp A-G, Denis MG. Efficiency of the Therascreen® RGQ PCR kit for the detection of EGFR mutations in non-small cell lung carcinomas. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 15 févr 2014;429:8-11.
86. Bai H, Wang Z, Chen K, Zhao J, Lee JJ, Wang S, et al. Influence of chemotherapy on EGFR mutation status among patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 sept 2012;30(25):3077-83.
87. Goto K, Ichinose Y, Ohe Y, Yamamoto N, Negoro S, Nishio K, et al. Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum: from IPASS, a phase III study of gefitinib or carboplatin/paclitaxel in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. janv 2012;7(1):115-21.
88. 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 Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 mars 2009;15(6):2076-84.
89. Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, Mach SL, O'Connell A, Messineo MM, et al. Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 mars 2014;20(6):1698-705.
90. Nakamura T, Sueoka-Aragane N, Iwanaga K, Sato A, Komiya K, Kobayashi N, et al. Application of a highly sensitive detection system for epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. sept 2012;7(9):1369-81.
91. Luo J, Shen L, Zheng D. Diagnostic value of circulating free DNA for the detection of EGFR mutation status in NSCLC: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep [Internet]*. 9 sept 2014 [cité 20 sept 2014];4. Disponible sur: <http://www.nature.com/srep/2014/140903/srep06269/full/srep06269.html>
92. Nygaard AD, Garm Spindler K-L, Pallisgaard N, Andersen RF, Jakobsen A. The prognostic value of KRAS mutated plasma DNA in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth*. mars 2013;79(3):312-7.
93. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. mars 2012;13(3):239-46.
94. Diaz LA, Bardelli A. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *J Clin Oncol*. 21 janv 2014;JCO.2012.45.2011.
95. Punnoose EA, Atwal S, Liu W, Raja R, Fine BM, Hughes BGM, et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 avr 2012;18(8):2391-401.
96. Marcq M, Vallee 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.
97. Merlin J-L. Les inhibiteurs de tyrosine kinase en oncologie. *Lett Pharmacol*. 2008;22(2):51-62.

Auteur : Mehdi SAKKA

Titre du mémoire de thèse :

Etude du statut mutationnel EGFR dans l'ADN circulant plasmatique chez douze patients ayant un cancer pulmonaire non à petites cellules traités par inhibiteur de tyrosine kinase

Résumé de la thèse :

Le cancer pulmonaire est l'un des plus fréquents en France et celui qui fait le plus de victimes par an. De nouvelles molécules, inhibiteurs de tyrosine kinase, ont reçu l'AMM ces dernières années quand la tumeur présente une anomalie moléculaire activatrice du gène EGFR. La recherche dans l'ADN circulant de l'anomalie EGFR par des biopsies liquides qui était présente dans leur tumeur chez 12 patients en stade IV du CHU de Nantes et du CH de La Roche sur Yon a été faite dans le cadre du suivi de leur traitement. Les résultats montrent une tendance pour l'intérêt pronostique avec la réapparition de l'anomalie chez un certain nombre de patients en même temps que la rechute du cancer. La détection précoce de la mutation T790M peut permettre aussi d'anticiper un échappement du traitement. Une cohorte plus grande pourrait confirmer ces résultats.

Mots-clés : Cancer pulmonaire non à petites cellules, EGFR, Inhibiteur de tyrosine kinase, gefitinib, erlotinib, ADN circulant, biopsies liquides.

Jury :

Président : Monsieur le Professeur Jean-Marie BARD, PU-PH, biochimie générale et biochimie appliquée, faculté de Pharmacie (Nantes)

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Marc DENIS, PU-PH, chef de service de biochimie, faculté de Médecine (Nantes)

Membres du jury : Madame le Docteur Acya BIZIEUX, PH, Oncologie médicale, (La Roche sur Yon)

Monsieur le Professeur Stéphane BEZIEAU, PU-PH, chef de service de génétique médicale, faculté de Médecine (Nantes)

Adresse de l'auteur :

24 rue de Siam

29200 Brest