



Université de Bourgogne
UFR des Sciences de Santé
Circonscription Médecine



ANNEE 2021

N°

**CONTRIBUTION DE LA BIOPSIE LIQUIDE DANS LA PRISE EN CHARGE DES PATIENTS ATTEINTS
DE CANCER PULMONAIRE NON A PETITES CELLULES METASTATIQUES**

***CONTRIBUTION OF LIQUID BIOPSY IN THE MANAGEMENT OF PATIENTS
WITH METASTATIC NON-SMALL CELL LUNG CANCER***

THESE

Présentée par Lisa CHASSAGNE

à l'UFR des Sciences de Santé de Dijon
Circonscription Médecine

et soutenue publiquement le 18 juin 2021

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

Par

Lisa CHASSAGNE

Née le 01/02/1991

A Aix-en-Provence (13)

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à la disposition de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur.

Ceci implique une obligation de citation et de référencement dans la rédaction de vos travaux.

D'autre part, toutes contrefaçons, plagats, reproductions illicites encourt une poursuite pénale.

De juridiction constante, en s'appropriant tout ou partie d'une œuvre pour l'intégrer dans son propre document, l'étudiant se rend coupable d'un délit de contrefaçon (au sens de l'article L.335.1 et suivants du code de la propriété intellectuelle). Ce délit est dès lors constitutif d'une fraude pouvant donner lieu à des poursuites pénales conformément à la loi du 23 décembre 1901 dite de répression des fraudes dans les examens et concours publics.



Université de Bourgogne
UFR des Sciences de Santé
Circonscription Médecine



ANNEE 2021

N°

**CONTRIBUTION DE LA BIOPSIE LIQUIDE DANS LA PRISE EN CHARGE DES PATIENTS ATTEINTS
DE CANCER PULMONAIRE NON A PETITES CELLULES METASTATIQUES**

***CONTRIBUTION OF LIQUID BIOPSY IN THE MANAGEMENT OF PATIENTS
WITH METASTATIC NON-SMALL CELL LUNG CANCER***

THESE

Présentée par Mme Lisa CHASSAGNE

à l'UFR des Sciences de Santé de Dijon
Circonscription Médecine

et soutenue publiquement le **18 juin 2021**

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

Par

Lisa CHASSAGNE

Née le 01/02/1991

A Aix-en-Provence (13)

Année Universitaire 2020-2021
au 1^{er} Septembre 2020

Doyen :
Assesseurs :

M. Marc MAYNADIÉ
M. Pablo ORTEGA-DEBALLON
Mme Laurence DUVILLARD

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

			Discipline
M.	Jean-Louis	ALBERINI	Biophysiques et médecine nucléaire
M.	Sylvain	AUDIA	Médecine interne
M.	Marc	BARDOU	Pharmacologie clinique
M.	Jean-Noël	BASTIE	Hématologie - transfusion
M.	Emmanuel	BAULOT	Chirurgie orthopédique et traumatologie
M.	Christophe	BEDANE	Dermato-vénéréologie
M.	Yannick	BEJOT	Neurologie
Mme	Christine	BINQUET	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
M.	Philippe	BONNIAUD	Pneumologie
M.	Alain	BONNIN	Parasitologie et mycologie
M.	Bernard	BONNOTTE	Immunologie
M.	Olivier	BOUCHOT	Chirurgie cardiovasculaire et thoracique
M.	Belaïd	BOUHEMAD	Anesthésiologie - réanimation chirurgicale
M.	Alexis	BOZORG-GRAYELI	Oto-Rhino-Laryngologie
M.	Alain	BRON	Ophtalmologie
M.	Laurent	BRONDEL	Physiologie
Mme	Mary	CALLANAN (WILSON)	Hématologie type biologique
M.	Patrick	CALLIER	Génétique
Mme	Catherine	CHAMARD-NEUWIRTH	Bactériologie - virologie; hygiène hospitalière
M.	Pierre-Emmanuel	CHARLES	Réanimation
M.	Jean-Christophe	CHAUVET-GELINIER	Psychiatrie d'adultes, Addictologie
M.	Nicolas	CHEYNEL	Anatomie
M.	Alexandre	COCHET	Biophysique et médecine nucléaire
M.	Luc	CORMIER	Urologie
M.	Yves	COTTIN	Cardiologie
M.	Charles	COUTANT	Gynécologie-obstétrique
M.	Gilles	CREHANGE	Oncologie-radiothérapie
Mme	Catherine	CREUZOT-GARCHER	Ophtalmologie
M.	Frédéric	DALLE	Parasitologie et mycologie
M.	Alexis	DE ROUGEMONT	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
M.	Hervé	DEVILLIERS	Médecine interne
M.	Serge	DOUVIER	Gynécologie-obstétrique
Mme	Laurence	DUVILLARD	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Olivier	FACY	Chirurgie générale
Mme	Laurence	FAIVRE-OLIVIER	Génétique médicale
Mme	Patricia	FAUQUE	Biologie et Médecine du Développement
Mme	Irène	FRANCOIS-PURSSELL	Médecine légale et droit de la santé
Mme	Marjolaine	GEORGES	Pneumologie
M.	François	GHIRINGHELLI	Cancérologie
M.	Pierre Grégoire	GUINOT	Anesthésiologie – réanimation chirurgicale
M.	Frédéric	HUET	Pédiatrie
M.	Pierre	JOUANNY	Gériatrie
M.	Sylvain	LADOIRE	Histologie
M.	Gabriel	LAURENT	Cardiologie
M.	Côme	LEPAGE	Hépatogastroentérologie
M.	Romaric	LOFFROY	Radiologie et imagerie médicale
M.	Luc	LORGIS	Cardiologie

M.	Jean-Francis	MAILLEFERT	Rhumatologie
M.	Cyriaque Patrick	MANCKOUNDIA	Gériatrie
M.	Sylvain	MANFREDI	Hépatogastroentérologie
M.	Laurent	MARTIN	Anatomie et cytologie pathologiques
M.	David	MASSON	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Marc	MAYNADIÉ	Hématologie – transfusion
M.	Marco	MIDULLA	Radiologie et imagerie médicale
M.	Thibault	MOREAU	Neurologie
Mme	Christiane	MOUSSON	Néphrologie
M.	Paul	ORNETTI	Rhumatologie
M.	Pablo	ORTEGA-DEBALLON	Chirurgie Générale
M.	Pierre Benoit	PAGES	Chirurgie thoracique et vasculaire
M.	Jean-Michel	PETIT	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
M.	Christophe	PHILIPPE	Génétique
M.	Lionel	PIROTH	Maladies infectieuses
Mme	Catherine	QUANTIN	Biostatistiques, informatique médicale
M.	Jean-Pierre	QUENOT	Réanimation
M.	Patrick	RAY	Médecine d'urgence
M.	Patrick	RAT	Chirurgie générale
M.	Jean-Michel	REBIBOU	Néphrologie
M.	Frédéric	RICOLFI	Radiologie et imagerie médicale
M.	Paul	SAGOT	Gynécologie-obstétrique
M	Maxime	SAMSON	Médecine interne
M.	Emmanuel	SAPIN	Chirurgie Infantile
M.	Emmanuel	SIMON	Gynécologie-obstétrique
M.	Éric	STEINMETZ	Chirurgie vasculaire
Mme	Christel	THAUVIN	Génétique
M.	Benoît	TROJAK	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
M.	Pierre	VABRES	Dermato-vénéréologie
M.	Bruno	VERGÈS	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
M.	Narcisse	ZWETYENGA	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie

PROFESSEURS EN SURNOMBRE

M.	Alain	BERNARD (surnombre jusqu'au 31/08/2021)	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M.	Pascal	CHAVANET (Surnombre jusqu'au 31/08/2021)	Maladies infectieuses

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES MEDICALES

			Discipline Universitaire
Mme	Lucie	AMOUREUX BOYER	Bactériologie
Mme	Louise	BASMACIYAN	Parasitologie-mycologie
Mme	Shaliha	BECHOUA	Biologie et médecine du développement
M.	Mathieu	BLOT	Maladies infectieuses
M.	Benjamin	BOUILLET	Endocrinologie
Mme	Marie-Claude	BRINDISI	Nutrition
Mme	Marie-Lorraine	CHRETIEN	Hématologie
Mme	Vanessa	COTTET	Nutrition
M.	Damien	DENIMAL	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	Ségolène	GAMBERT	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	Françoise	GOIRAND	Pharmacologie fondamentale
M.	Charles	GUENANCIA	Physiologie
Mme	Agnès	JACQUIN	Physiologie
M.	Alain	LALANDE	Biophysique et médecine nucléaire
M.	Louis	LEGRAND	Biostatistiques, informatique médicale
Mme	Stéphanie	LEMAIRE-EWING	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Pierre	MARTZ	Chirurgie orthopédique et traumatologie
M.	Alain	PUTOT	Gériatrie
M.	Paul-Mickaël	WALKER	Biophysique et médecine nucléaire

PROFESSEURS EMERITES

M.	Laurent	BEDENNE	(01/09/2017 au 31/08/2020)
M.	Jean-François	BESANCENOT	(01/09/2020 au 31/08/2023)
M.	Bernard	BONIN	(01/09/2020 au 31/08/2023)
M.	François	BRUNOTTE	(01/09/2020 au 31/08/2023)
M.	Jean-Marie	CASILLAS-GIL	(01/09/2020 au 31/08/2023)
M.	Philippe	CAMUS	(01/09/2019 au 31/08/2022)
M.	Jean	CUISENIER	(01/09/2018 au 31/08/2021)
M.	Jean-Pierre	DIDIER	(01/11/2018 au 31/10/2021)
Mme	Monique	DUMAS	(01/09/2018 au 31/08/2021)
M.	Claude	GIRARD	(01/01/2019 au 31/08/2022)
M.	Maurice	GIROUD	(01/09/2019 au 31/12/2021)
M.	Patrick	HILLON	(01/09/2019 au 31/08/2022)
M.	François	MARTIN	(01/09/2018 au 31/08/2021)
M.	Henri-Jacques	SMOLIK	(01/09/2019 au 31/08/2022)
M.	Pierre	TROUILLOUD	(01/09/2020 au 31/08/2023)

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

Mme	Katia	MAZALOVIC	Médecine Générale
Mme	Claire	ZABAWA	Médecine Générale

PROFESSEURS ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE

M.	Didier	CANNET	Médecine Générale
M.	Arnaud	GOUGET	Médecine Générale
M.	François	MORLON	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE

M.	Jérôme	BEAUGRAND	Médecine Générale
M.	Clément	CHARRA	Médecine Générale
Mme	Anne	COMBERNOUX -WALDNER	Médecine Générale
M.	Benoit	DAUTRICHE	Médecine Générale
M.	Alexandre	DELESVAUX	Médecine Générale
M.	Rémi	DURAND	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme	Lucie	BERNARD	Anglais
M.	Didier	CARNET	Anglais
Mme	Catherine	LEJEUNE	Pôle Epidémiologie
M.	Gaëtan	JEGO	Biologie Cellulaire

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mme	Marianne	ZELLER	Physiologie
-----	----------	--------	-------------

PROFESSEURS AGREGES de L'ENSEIGNEMENT SECONDAIRE

Mme	Marceline	EVRARD	Anglais
Mme	Lucie	MAILLARD	Anglais

PROFESSEURS CERTIFIES

Mme	Anaïs	CARNET	Anglais
M.	Philippe	DE LA GRANGE	Anglais

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

M.	Mathieu	BOULIN	Pharmacie clinique
M.	François	GIRODON	Sciences biologiques, fondamentales et cliniques
Mme	Evelyne	KOHLI	Immunologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

M.	Philippe	FAGNONI	Pharmacie clinique
M.	Marc	SAUTOUR	Botanique et cryptogamie
M.	Antonin	SCHMITT	Pharmacologie

L'UFR des Sciences de Santé de Dijon, Circonscription Médecine, déclare que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

COMPOSITION DU JURY

Président :

Monsieur le Professeur Laurent MARTIN

Membres :

Monsieur le Professeur Patrick CALLIER

Madame le Professeur Marjolaine GEORGES

Monsieur le Docteur Pascal FOUCHER

Remerciements

A mon Président et Directeur de thèse, Professeur Laurent Martin,

Je vous remercie de votre confiance et pour l'encadrement, la bienveillance et la disponibilité que vous m'avez accordé durant ces quatre dernières années, tant dans l'apprentissage que pour l'écoute et la patience dont vous avez fait preuve lors de la direction de ce travail.

Veillez recevoir mes plus sincères remerciements et mon plus profond respect.

Au Professeur Patrick Callier, membre du jury

Vous me faites l'honneur de juger mon travail de thèse et je vous en remercie. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

Au Professeur Marjolaine Georges, membre du jury

Vous me faites l'honneur de juger mon travail de thèse et je vous en remercie. Veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère gratitude et de mon profond respect.

Au Docteur Pascal Foucher, membre du jury

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Votre regard d'oncologue me paraissait essentiel et m'honore. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A l'équipe du CHU de Dijon. A tous les médecins qui ont contribué à ma formation, pour la qualité de leur enseignement et leur écoute, un grand merci aux Dr Mathilde Funes de la Vega, Marie Hélène Aubriot-Lorton, Haingo Andrianaina, Alice Millière, Catherine Douchet, Selim Ramla, Charles-Henry Bretagne et Fara Arizay. Aux techniciens, en particulier Anne-Cécile, Rachelle, Martine, Amandine et Marion, les après-midis de macro m'ont paru beaucoup moins longues grâce à vous.

A l'équipe du CGFL. Ces deux semestres passés à vos côtés m'ont beaucoup aidé tant sur le plan professionnel que personnel. Je tiens à remercier sincèrement le Dr Laurent Arnould, Françoise Beltjens, Emilie Courcet et Céline Charon-Barra, apprendre à vos côtés fut un réel plaisir. Au Dr Arnould, en particulier, merci infiniment de votre bienveillance, vos conseils ont été des plus précieux. Aux techniciens, en particulier Laurène, Alison, Florence, Inès, Max et Nadège, j'ai adoré mes moments macro passés avec vous.

A l'équipe de Cypath. Ce n'est encore que le début, mais je tiens déjà à vous remercier pour votre accueil si chaleureux. Merci à Tibor, Franck, Françoise, Dominique et Laurence de l'enthousiasme avec lequel vous me partagez toutes ces connaissances. C'est déjà un réel plaisir d'apprendre avec vous.

Au service de cytogénétique,

Vous m'avez tous accueilli avec beaucoup de gentillesse et de bienveillance lors de mon premier semestre au CHU et à Dijon. En particulier Sandrine, Stéphanie, Marlène et Nadège qui sont devenues plus que des relations de travail.

Au service de médecine légale,

Un grand merci aux Pr Irène François-Pursell, Dr Bruno Bègue et Dr Séverine Gilard-Pioc pour ce semestre en médecine légale. Une aventure sans précédent (cela va de soi) que je ne suis pas prête d'oublier. Les autopsies, les levées de corps, les affaires criminelles, les consultations, cette part d'humanisme inhérente à la pratique de la médecine légale m'ont fait grandir et relativiser bien des choses en seulement 6 mois à vos côtés. Aux secrétaires, infirmières et aux techniciens de la chambre mortuaire, un grand merci, sans vous cette expérience n'aurait pas été la même. Et à Mme Fromageot, qui a su me supporter malgré mes trois AES.

Aaaaaaallô ? Ossama ? ouiii, ça y est, on l'a fait. Les TS sont saines, oui ! A mon rayon de soleil tout au long de cet internat. Tant de souvenirs, les premiers repas en tête en tête au self à se rappeler qu'on a fait le bon choix, les pauses aux PTB, les séances motivations hebdomadaires voire journalières. Ce dernier semestre au CGFL fut un pur bonheur grâce à toi et à Carlito, ces moments de fou rire et ces sessions bitch Carole B (je ne suis pas sûre d'avoir le droit de la citer haha), je n'oublierai rien. Grosse pensée à Sarah et pas seulement ;). PS : IBAN FR 32 93945 539538232 au cas où ça déborde à Metz.

A Anne, mon pilier sur Dijon, de nos grandes discussions sur la vie dans les bureaux de médecine légale, passant par les chants de disney (toujours en médecine légale d'ailleurs), les soirées internats, les repas chez toi, encore nos discussions en rentrant de soirées sous l'arc de triomphe et toujours nos discussions quand j'avais besoin de toi pendant mes soirées de l'angoisse de la mort qui tue (sans mauvais jeux de mots), tu as toujours été là et je t'en remercie mille fois pour ça. Je suis heureuse d'entamer cette nouvelle aventure à Lyon avec toi. Xo Xo Ma nannonette.

A ma Paulette, un internat sans toi, tes frasques, ton humour et tes « mais quel enfer », serait comme une journée au PTB sans fœtus, une macro sans colon ischémique, une lobectomie sans agrafe, un compte rendu sans TNR12, bref juste unimaginable. Tu as été ma bouffée de délire à moi et dieu seul sait que mon internat en a été plus léger grâce à toi. Je te souhaite plein de bonnes choses ma Paulette. Mille bisous.

A ma Juliette, merci d'avoir toujours été là dans les bons comme les mauvais moments. Ton soutien et ton amitié ont été très précieux pour moi. J'ai adoré ces moments passés avec toi surtout les matchs de basket, j'espère qu'on aura l'occasion de remettre ça. (et je rigole pas, je suis prête à revenir à Dijon pour un match trimestriel, je sais pas, qu'est-ce que tu en dis ?)

Aux trois gros, les meilleurs, Aurélien, Gilles et Régis, vous croyez vous être débarrassés de moi, que nenni, j'arrive à Lyon avec l'intention tenace de vous embêter encore un peu. Mais surtout je tenais à vous remercier d'avoir été présents pour nous, accessibles, toujours de bonne humeur, bref je suis heureuse d'avoir fait votre connaissance et de vous avoir eu comme co-internes mais pas seulement, comme amis aussi.

Et Régis prépare toi en novembre pour de nouveaux DOMs-TOMS, better than ever.

A Sethi, mon coup de cœur dijonnais, malgré des débuts pas comme les autres (et oui je suis moins cool sans les deux verres de rosé), il faut l'avouer, tu as su être là dans les moments difficiles (et je ne parle pas de ma défaite aux boules, je devrais dire pétanque, moins ambiguë, même si cette dernière m'a fendu le cœur). J'ai réellement pris conscience de la personne que tu étais, en plus d'être impressionnant, intelligent, étonnant, plein de ressources et spontané, tu as été bienveillant, à l'écoute et plein de bonnes intentions. Même si notre amitié a ses originalités j'ai la sensation qu'on gardera longtemps contact, du moins je l'espère sincèrement.

A Charles-Henry, quelle belle rencontre que la tienne, voisin adorable, assistant à l'écoute et ami sans aucun doute, je te remercie d'avoir été présent ces deux dernières années. Une grosse pensée pour petit Bouchon et à Gabrielle.

A Anthony, the love machine, à ce mentor qui a mis du temps à m'apprécier, je tiens à te dire que tu es une belle personne et te conseille sincèrement de virer cette carapace que tu veux professionnelle mais qui empêche les gens de te voir tel que je te vois. Je te souhaite tellement de belles choses. J'espère que l'on se reverra.

A tous mes autres co-internes,

Mathilde, Carlito, Romain, Céline, Basile, que de bons moments passés avec vous, vous êtes vraiment des co-internes en or, ne changez rien. Si vous avez besoin de quoique ce soit n'hésitez pas, ce sera toujours avec plaisir.

Ségolène, Alexia, et les plus jeunes, nous n'avons pas eu le temps de faire vraiment connaissance, mais je vous souhaite le meilleur des internats possibles.

A tous ceux qui m'ont aidé à réaliser ce travail,

A Benjamin et Caroline, merci d'avoir été présents tout au long de ce travail. Votre aide a été des plus précieuses pour mener ce projet à bien. Caroline, un merci de plus pour ta disponibilité, grâce à toi je garde un bon souvenir d'un certain dimanche soir, 23h, passé à finir mon pdf pour carrefour pathologie.

Aux filles de bio mol, en particulier Marie Lyse et Alicia, j'ai apprécié mon incursion dans les parcours techniques du service. Grâce à vous, l'écran de fumée s'est dissipé un peu plus sur ce monde particulier qu'est la biologie moléculaire.

A mes amis les plus chers,

A Audrey

Un ange tombé du ciel, je raconte cette histoire à chaque fois que je parle de toi, c'est dire combien tu m'es chère. Je n'oublierai jamais quand tu es venue m'aider alors qu'on se connaissait à peine, on s'était parlé deux fois maximum. Tu as déboulé dans cette salle verte, après un simple SMS, avec un planning et des fiches prep-ECN, depuis on ne s'est plus lâchées. Je n'aurai voulu passer cette D4 avec personne d'autre. Ces pauses café (au moins mille, je suis sûre) à se rassurer, à réviser, à se confesser sur nos plannings jamais tenus, sont les meilleurs souvenirs de cette année, dieu seul sait, cauchemardesque mais aussi les meilleurs souvenirs que j'ai tout simplement. Tu es beaucoup pour moi.

A Fabrice,

Rencontré sur les bancs de la fac, qui aurait prédit que j'aurais réussi à gagner ton amitié. Et je suis très heureuse de t'avoir gardé près de moi depuis la P2, tu es une personne comme je n'en ai jamais connu. Chacun est unique, mais alors toi tu dépasses l'imagination. Ton amitié n'a pas de prix et je suis honorée de faire partie de tes amis. Tu pourras toujours compter sur moi Fab.

A Mélo,

Cela fait déjà 26 ans que l'on se connaît, maternelle, primaire, collège ensemble, puis on s'est perdu de vue, jusqu'à un certain soir d'hiver pendant ma P1. Nostalgique, je t'ai appelé sans trop réfléchir et tu m'as répondu, on s'est parlé avec une complicité intacte malgré les années passées. Depuis tu prends toujours de mes nouvelles, tu te débrouilles pour qu'on se voit malgré mes études chargées. Je voulais te dire que j'en avais conscience et que je t'en remercie du plus profond de mon cœur.

A Jérémy,

Chiquito, 10 ans déjà que ta bonne humeur ponctue ma vie de paillettes. Même si on ne voit pas autant que je le souhaiterais, je voulais te remercier d'être toujours là (où je m'y attends le moins hahaha). Tu es toujours plein de surprises et tu me laisses toujours des souvenirs impérissables. J'espère que l'on pourra un peu plus se voir pour créer d'autres souvenirs inoubliables.

A Maxence,

Merci pour ta générosité toute particulière ces quatre dernières années d'internat. J'ai été heureuse de faire ta connaissance, tu vas me manquer à Lyon.

A ma famille que j'aime tant,

A mes parents,

Un merci ne suffirait pas à vous montrer toute la reconnaissance et l'amour que je vous porte. Vous avez été pour moi un modèle, un soutien inconditionnel (j'ai conscience que ça n'a pas toujours été facile pour vous) durant ces longues années d'études m'épaulant dans les situations difficiles, un refuge plein d'amour et ma bouffée d'air quand j'avais l'impression d'en manquer. Vous me comblez d'amour. Je vous aime.

A mon petit frère,

Merci d'être toujours à mes côtés dans les bons comme les mauvais moments. Je te souhaite de réussir dans tes études. Et sache que je serai toujours là si tu as besoin de moi. Je t'aime fort.

A mon grand-père, mes oncles et tantes, à mes cousins et cousines.

Merci pour l'amour et le soutien que vous m'avez apporté de manière inconditionnelle. Je sais que la distance et mes études ne m'ont pas permis beaucoup de choses ces dernières années mais je vous savais toujours présents dans mon cœur. « I just call to say, I love you » comme dirait quelqu'un.

A ma grand-mère,

Qui aurait, j'en suis sûre, été fière de moi.

Je ne t'oublie pas.

SERMENT D'HIPPOCRATE

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

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

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité.

Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

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

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

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera.

Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

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

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

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

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

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

Table des matières

I. Introduction	18
A. Généralités-Épidémiologie	18
B. Facteurs de risque	18
C. Rappels anatomiques et histologiques.....	20
D. Classification histologique des cancers pulmonaires.....	20
E. Prise en charge thérapeutique des CBNPC métastatiques	25
F. Cytogénétique et biologie moléculaire.....	26
G. Biopsie liquide	29
H. Contexte actuel et objectif de l'étude	30
II. Article	32
A. Abstract.....	32
B. Introduction.....	33
C. Materials and Methods	34
1. Study design and patients	34
2. Sample collection and processing	35
3. EGFR Mutation and MET amplification analyses.....	35
D. Results.....	37
1. Patient characteristics	37
2. EGFR mutation in LB of patients with suspected NSCLC	38
3. EGFR mutation in LB of patients with Metastatic NSCLC at baseline	39
4. EGFR mutation in LB of patients with progression on TKI.....	39
5. Concordance between Tumor Tissue and Liquid Biopsy.....	39
E. Discussion.....	40
F. Conclusion	43
III. Bibliographie.....	45
IV. Annexes	48

Table des figures et tableaux

Figure 1. Principaux types histologiques de cancers pulmonaires.	24
Figure 2. Proportion des anomalies géniques retrouvées dans les CBNPC d'après le rapport d'activité des plateformes de biologie moléculaire de l'INCa en 2012.	27
Figure 3. Les mutations oncogéniques de l'EGFR dans le cancer bronchique	28
Figure 4. Illustration de l'issue de cellules tumorales circulantes, d'ADN et ARN circulant dans le sang. .	29
Figure 6. Flow chart of the retrospective study.	34
Figure 7. Decision tree analysis.	36
Figure 8. Median's evolution of turnaround time from 2016 at 2019.	38
Table 1. Classification OMS 2015 des cancers broncho-pulmonaires.	21
Table 2. Patient's characteristic.	37
Table 3. Paired analysis at baseline and progression on TKI.	40

Annexes

Annexe 1. Thérapies ciblées mises sur le marché depuis 2009 dans le cadre des CBNPC localement avancés ou métastatiques porteurs d'anomalies moléculaires.	48
Annexe 2. CAPTURE Solid Tumor Solution gene panel (Sophia genetics®).	48
Annexe 3. 8 ^{ème} classification TNM du cancer du poumon	49
Annexe 4. Classification du cancer du poumon en stade clinique	50
Annexe 5. Schématisation des analyses possiblement nécessaires sur prélèvement de tissu tumoral pour une prise en charge thérapeutique optimale d'un CBNPC.	50
Annexe 6. Evolution from 2016 to 2019 of turnaround time from registration and from venous samples.	51

Liste des abréviations

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ADNlc : ADN libre circulant

cfDNA : Cell free DNA

INCa : Institut National du Cancer

BL : Biopsie Liquide

LB : Liquid Biopsy

CP : Carcinome broncho-Pulmonaire

CBNPC : Carcinome Broncho-pulmonaire Non à Petites Cellules

CBPC : Carcinome Broncho-pulmonaire à Petites Cellules

EGFR : Epithelial Growth Factor

NSCLC : Non-Small Cell Lung Cancer

NGS : Next Generation Sequencing ou Séquençage Nouvelle génération

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ddPCR : Droplet Digital Polymerase Chain Reaction

dPCR : Digital Polymerase Chain Reaction

PCR : Polymerase Chain Reaction

TKI : Tyrosine Kinase Inhibitor

ITK : Inhibiteur de Tyrosine Kinase

TTF1 : Thyroïd Transcription Factor 1

I. Introduction

A. Généralités-Épidémiologie

En France, l'incidence du cancer broncho-pulmonaire (CP) est estimée, en 2018, à 46 363 nouveaux cas dont 67% surviennent chez l'homme. Il représente chaque année près de 11% de l'ensemble des nouveaux cancers. C'est le 2^{ème} cancer le plus fréquent chez l'homme et le 3^{ème} chez la femme. Entre 2000 et 2005, alors que son incidence était en légère baisse chez l'homme (-0,5% liée à une diminution de la consommation tabagique), elle a continué à augmenter chez la femme (+ 5,8% sur cette même période, et triplement pendant ces 20 dernières années).

L'âge moyen au diagnostic est de 67 ans chez l'homme et à 65 ans chez la femme. Avec une survie à 5 ans de l'ordre de 17% et de 10% à 10 ans, le cancer broncho-pulmonaire est un cancer de mauvais pronostic. Ce mauvais pronostic est lié au diagnostic souvent tardif, qui ne permet pas de traitement chirurgical curatif. En effet, plus de 70% des patients présentant un cancer pulmonaire sont diagnostiqués à un stade avancé, essentiellement car les symptômes apparaissent tardivement.

Il représente la première cause de décès (toutes causes confondues) chez l'homme entre 45 et 64 ans en France. En 2018, plus de 33 117 décès lui sont imputables, ce qui représente près de 21% des décès par cancer. C'est la première cause de décès chez l'homme et la deuxième cause de décès par cancer chez la femme (1).

B. Facteurs de risque

Le tabac est le principal facteur de risque du cancer pulmonaire, en effet le tabagisme actif est responsable de 80% des cancers bronchiques. Les fumeurs ont 10 à 20 fois plus de risque de développer un cancer du poumon que les non-fumeurs (2). Le risque de cancer augmente notamment en fonction de la quantité de tabac fumé ainsi que de l'ancienneté du tabagisme. Un bénéfice significatif de l'arrêt du tabac, augmentant avec la durée de l'abstinence, a été observé pour tous les cancers associés au tabagisme. Néanmoins, les anciens fumeurs conservent un risque plus élevé de cancer du poumon comparé aux personnes du même âge n'ayant jamais fumé, même après une longue période

d'abstinence. Enfin, l'arrêt du tabac après un cancer du poumon améliore le pronostic de survie à 5 ans et diminue le risque de récurrence et le risque de développer un second cancer.

Le tabagisme passif est également un facteur de risque. Il est lié à l'inhalation de manière involontaire de la fumée qui s'échappe de la cigarette d'un fumeur appelé courant secondaire. Il a été démontré qu'une personne en situation de tabagisme passif voit son risque de développer un cancer du poumon augmenté de 26% par rapport à un non-fumeur. On estime que le tabagisme passif est responsable du quart des CP des non-fumeurs.

Le rôle des carcinogènes professionnels est souvent sous-estimé en raison du facteur confondant que représente le tabagisme. L'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) estime que 15% des cas de CP seraient d'origine professionnelle. Si l'amiante est de loin le facteur de risque le plus fréquent (environ 50% des CP d'origine professionnelle), de nombreux métaux lourds sont aussi en cause (3,4).

Le Radon est un gaz radioactif incolore et inodore naturellement présent dans l'environnement, présent dans le sol et la pierre. Il pénètre dans l'organisme principalement avec l'air inhalé. Ce dernier a été classé cancérigène pulmonaire pour l'homme par le CIRC en 1987 et par l'IARC en 1988. Plusieurs études ont montré une association positive entre le risque de cancer du poumon notamment chez les non-fumeurs et l'exposition domestique au radon. L'estimation du risque par unité d'exposition est d'environ 4% pour 100 Bq/m³ (5).

La pollution atmosphérique est un facteur de risque de cancer du poumon, mis en évidence en 2008 par l'expertise collective de l'Inserm (Institut national de la santé et de la recherche médicale) et de l'Afsset (Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail). Cette pollution, d'origine automobile et industrielle est due à des gaz, comme le dioxyde de soufre (SO₂), le dioxyde d'azote (NO₂), l'ozone (O₃) et les fumées de diesel (6).

Les antécédents personnels d'affections respiratoires sont également un facteur de risque de cancer du poumon, en particulier les personnes atteintes de broncho-pneumopathie chronique obstructive, de silicose, de beryllose et de tuberculose. De même, les personnes ayant déjà présenté un CP ont davantage de risque de développer un deuxième CP que la population générale. Par ailleurs, un cas de CP familial augmente également le risque de survenue de ce cancer (7).

C. Rappels anatomiques et histologiques

L'appareil respiratoire possède deux constituants fonctionnels principaux, un système de conduction et de nettoyage de l'air inhalé et un mécanisme d'échange gazeux (8). La portion initiale du système de conduction est une suite de cavités (fosses nasales, sinus et rhinopharynx) dont le rôle est de nettoyer, réchauffer et humidifier l'air inhalé par les narines. L'air pénètre ensuite dans la trachée qui se divise de nombreuses fois pour former successivement les bronches souches, lobaires et segmentaires de diamètre décroissant pour aboutir in fine aux bronchioles terminales. Toutes ces structures sont bordées par un épithélium respiratoire constitué de cellules sécrétant du mucus piégeant ainsi les particules inhalées et de cellules ciliées mobilisant la fine couche de mucus ramenant ces particules vers la sortie.

Le système d'échanges gazeux est un vaste ensemble de culs-de-sac appelés alvéoles dont les parois contiennent un réseau très étendu de capillaires pulmonaires. Chaque alvéole forme une poche revêtue de cellules épithéliales aplaties appelées pneumocytes. Le tissu de soutien forme une mince couche sous cet épithélium et entoure d'assez nombreux capillaires qui forment un réseau dense péri-alvéolaire. Les échanges gazeux se font entre l'air contenu dans les alvéoles et le sang des capillaires pulmonaires.

Entre les bronchioles terminales, purement conductrices et les alvéoles, il existe une série de voies aériennes intermédiaires, les bronchioles respiratoires et les canaux alvéolaires, qui interviennent également dans les échanges gazeux.

D. Classification histologique des cancers pulmonaires

La classification d'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) des cancers broncho-pulmonaires a été réactualisée en 2015 afin de répondre aux nouvelles exigences diagnostiques et thérapeutiques en oncologie thoracique. Ainsi, un remembrement des adénocarcinomes en fonction de leur signature moléculaire et un regroupement des tumeurs neuroendocrines ont été adoptés dans la nouvelle classification OMS 2015 (9).

TYPE HISTOLOGIQUE	SOUS TYPE HISTOLOGIQUE
ADENOCARCINOMES 8140/3	Adénocarcinome lépidique† 8250/3
	Adénocarcinome acinaire 8551/3
	Adénocarcinome papillaire 8260/3
	Adénocarcinome micro papillaire† 8265/3
	Adénocarcinome solide 8230/3
	Adénocarcinome Invasif Mucineux† 8253/3
	Adénocarcinome invasif mixte 8254/3
	Adénocarcinome colloïde 8480/3
	Adénocarcinome fœtal 8333/3
	Adénocarcinome entérique† 8144/3
	Adénocarcinome avec invasion minime† Non-mucineux 8250/2 Mucineux 8257/3
	<i>Lésions pré-invasives</i>
	Hyperplasie adénomateuse atypique 8250/0
	Adénocarcinome in situ† Non mucineux 8410/2 Mucineux 8253/2
CARCINOMES EPIDERMOÏDES 8070/3	Carcinome malpighien kératinisant† 8071/3
	Carcinome malpighien non kératinisant† 8072/3
	Carcinome malpighien basaloïde† 8083/3
<i>Lésion pré-invasive</i>	Carcinome malpighien in situ 8070/2
TUMEURS NEUROENDOCRINES	Tumeur carcinoïde typique 8240/3
	Tumeur carcinoïde atypique 8249/3
	Carcinome à petites cellules 8041/3 composite 8045/3
	Carcinome neuroendocrine à grandes cellules 8013/3 composite 8013/3
<i>Lésion pré-invasive</i>	Hyperplasie neuroendocrine diffuse pulmonaire idiopathique 8040/0
CARCINOMES INDIFFERENCIE A GRANDES CELLULES 8012/3	
CARCINOMES ADENOSQUAMEUX 8560/3	
CARCINOMES SARCOMATOÏDES	Carcinome pléomorphe 8022/3
	Carcinome à cellules fusiformes 8032/3
	Carcinome à cellules géantes 8031/3
	Carcinosarcome 8980/3
	Blastome pulmonaire 8972/3
TUMEURS DE TYPE GLANDES SALIVAIRES	Carcinome mucoépidermoïde 8430/3
	Carcinome adénoïde kystique 8200/3
	Carcinome épithélial-myoépithélial 8562/3
	Adénome pléomorphe 8940/0
CARCINOMES INCLASSES	Carcinome "lymphoepithelioma-like" 8082/3
	Carcinome avec réarrangement NUT † 8023/3 63

Table 1. Classification OMS 2015 des cancers broncho-pulmonaires (9).

Types et sous-types histologiques des tumeurs épithéliales (Code ICDO). † Nouveaux termes ou termes modifiés depuis la classification OMS 2004.

Quatre grands types histologiques représentent à eux seuls 95% de la totalité des tumeurs malignes primitives du poumon :

- les adénocarcinomes, les carcinomes épidermoïdes, les carcinomes indifférenciés à grandes cellules longtemps regroupés sous le terme de carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBNPC),
- et les carcinomes bronchiques à petites cellules (CBPC).

Il faut préciser avant tout que le terme diagnostique CBNPC regroupe en fait tous les carcinomes broncho-pulmonaires autres que le CBPC dont la prise en charge spécifique diffère radicalement de celle des CBNPC, encore à ce jour. Ainsi pendant longtemps, lors du diagnostic, le pathologiste pouvait presque se contenter de séparer les tumeurs pulmonaires en CBNPC et CBPC, précision suffisante pour une prise en charge thérapeutique optimale dans les années 2000.

Les adénocarcinomes, développés aux dépens des pneumocytes représentent environ 50% de l'ensemble des CBNPC. Il s'agit du type histologique le plus fréquemment retrouvé chez les non-fumeurs et notamment chez la femme, généralement sous la forme de nodules périphériques. Le diagnostic histologique d'adénocarcinome broncho-pulmonaire se fait sur la présence d'une différenciation glandulaire ou de la mise en évidence d'une production de mucus ou de l'expression immunohistochimique d'un marqueur pneumocytaire. Les marqueurs les plus utilisés sont le TTF1 (thyroïd transcription factor 1) et la napsine A. L'antigène TTF1 est un facteur de transcription, d'où son marquage nucléaire en immunohistochimie. Il est exprimé dans le poumon normal par les pneumocytes de type II mais également par les cellules épithéliales normales de la thyroïde. Environ 75% des adénocarcinomes pulmonaires l'expriment.

Les carcinomes épidermoïdes représentent environ 30% de l'ensemble des CBNPC. Fortement liés au tabac, (plus de 90% des patients sont fumeurs), les carcinomes épidermoïdes se développent habituellement à partir des bronches sur des lésions de métaplasie malpighienne. Le diagnostic histologique d'un carcinome épidermoïde bien ou moyennement différencié repose sur la mise en évidence d'une kératinisation ou de ponts intercellulaires. En cas de prolifération tumorale peu différenciée, le diagnostic repose sur un immunomarquage diffus et intense par l'anticorps anti-p63 ou

p40 (marqueurs malpighiens) associé à l'absence de marquage par l'anticorps anti-TTF1 (marqueur pneumocytaire).

Le carcinome bronchique à petites cellules est une tumeur neuroendocrine de haut grade de malignité qui représente 15% des tumeurs malignes primitives pulmonaires. C'est le carcinome broncho-pulmonaire le plus fortement lié à la consommation tabagique. Il se caractérise par une prolifération dense de petites cellules ($< 3 \times$ taille d'un lymphocyte) au cytoplasme peu abondant (rapport nucléo-cytoplasmique élevé), à la chromatine granuleuse et au nucléole peu visible. L'index mitotique est élevé (≥ 10 mitoses par 2 mm^2 (10 HPF), moyenne de 80 par 2 mm^2) et les corps apoptotiques sont nombreux. Les marqueurs neuroendocrines (CD56, chromogranine A et synaptophysine) sont exprimés avec au moins un marqueur exprimé de façon intense et diffuse dans plus de 10% des cellules tumorales.

Dans l'ancienne classification OMS 2004, les carcinomes neuroendocrines à grandes cellules étaient un sous type de carcinomes à grandes cellules. A partir de 2015, le carcinome neuroendocrine à grandes cellules appartient à la catégorie des tumeurs neuroendocrines de haut grade de malignité au même titre que le carcinome à petites cellules. Il se caractérise par une prolifération de grandes cellules ($> 3 \times$ taille d'un lymphocyte) au cytoplasme plus ou moins abondant (rapport nucléo-cytoplasmique bas), renfermant un noyau irrégulier souvent nucléolé. L'index mitotique est élevé (≥ 10 mitoses par 2 mm^2 (10 HPF), moyenne de 80 par 2 mm^2) et la nécrose est fréquente. Les marqueurs neuroendocrines (CD56, chromogranine A et synaptophysine) sont également exprimés avec au moins un marqueur exprimé de façon intense et diffuse dans plus de 10% des cellules tumorales.

Les carcinomes indifférenciés à grandes cellules représentent environ 2,3% des CBPNPC. Le terme de carcinome à grandes cellules ne doit être retenu que sur les prélèvements d'exérèse chirurgicale car l'examen de la totalité de la tumeur est nécessaire pour exclure un contingent bien différencié. En effet, s'agissant d'un diagnostic d'exclusion, le carcinome à grandes cellules se définit par l'absence stricte de critère de différenciation morphologique et immuno-histochimique en faveur d'un adénocarcinome, d'un carcinome épidermoïde ou d'un carcinome neuroendocrine.

Les carcinomes adénoquameux sont rares, ils représentent moins de 5% des CBPNPC, ils sont constitués par deux contingents tumoraux, l'un glandulaire adénocarcinomeux, l'autre malpighien de type carcinome épidermoïde, chacun de ces constituants compte pour plus de 10 % de la surface tumorale.

Les carcinomes sarcomatoïdes sont rares, moins de 5% des CBPNPC, ils comprennent les carcinomes pléomorphes, à grandes cellules, à cellules géantes, le carcinosarcome et le blastome pulmonaire.

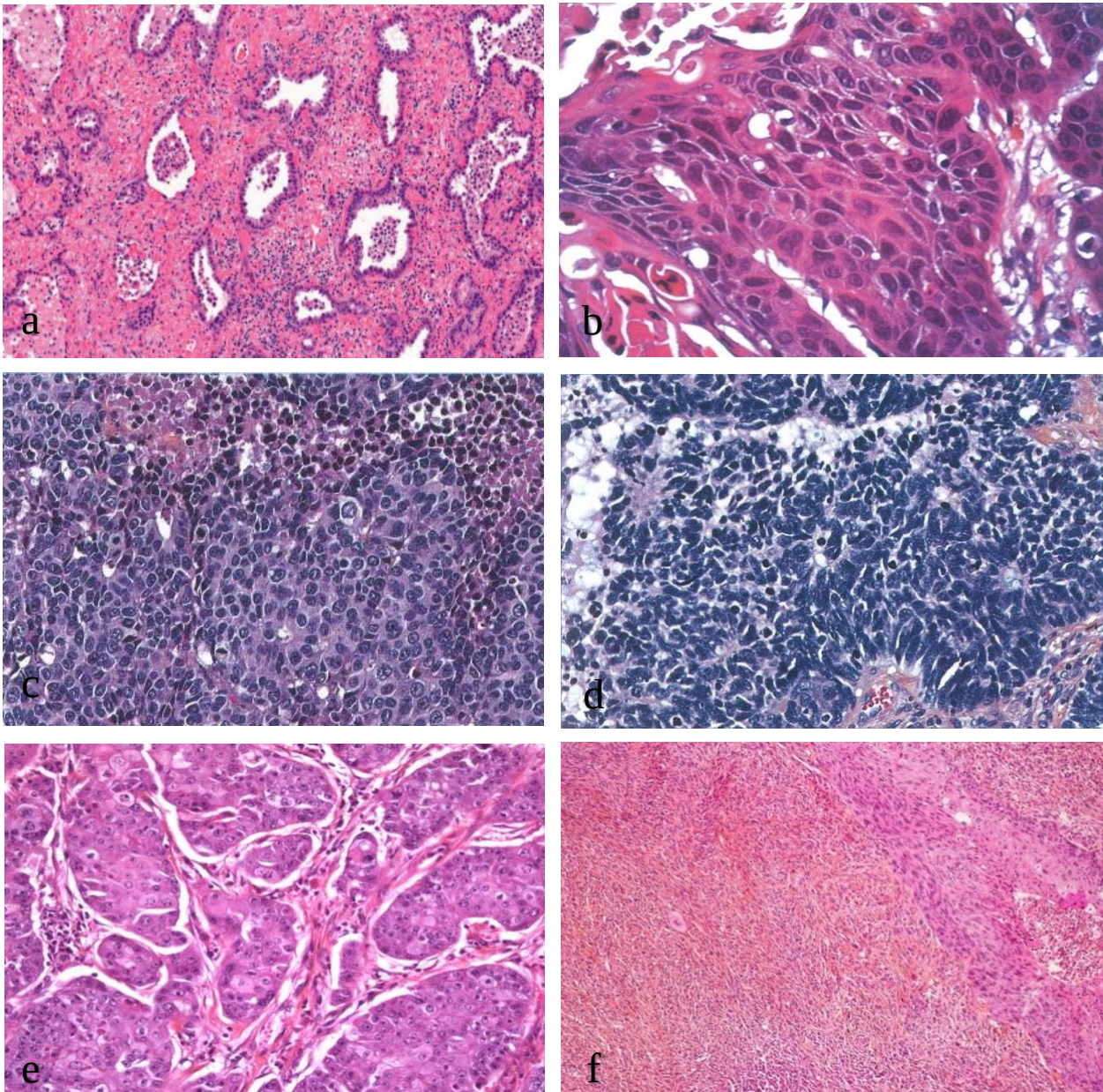


Figure 1. Principaux types histologiques de cancers pulmonaires.

a) Adénocarcinome acinaire, b) Carcinome épidermoïde bien différencié kératinisant, c) Carcinome neuroendocrine à grandes cellules, d) Carcinome à petites cellules, e) Carcinome indifférencié à grandes cellules, f) Carcinome sarcomatoïde (carcinome pléomorphe).

E. Prise en charge thérapeutique des CBNPC métastatiques

La prise en charge thérapeutique des CP dépend du type histologique et du stade clinique déterminé à partir de la classification TNM (Annexes 3 et 4) au moment du diagnostic (10). Une évaluation de l'état général du patient est nécessaire pour mettre en balance les protocoles thérapeutiques toujours discutés et validés en réunion de concertation pluridisciplinaire.

Dans les CBPC, le traitement de référence est basé sur une chimiothérapie à base de sels de platine associée à une radiothérapie thoracique pour les stades localisés. La chirurgie n'a pas d'indication dans la prise en charge des CBPC, sauf dans des circonstances exceptionnelles.

Dans les CBNPC de stades précoces (stades TNM I et II) et localement avancés (stade III), la résection chirurgicale constitue le traitement de référence et sa faisabilité doit toujours être évaluée.

Dans les CBNPC de stades métastatiques (stade TNM IV), le traitement systémique est la référence et dépend de la présence ou non d'altérations actionnables d'EGFR, ALK, ROS1 et BRAF par thérapie ciblée. Dans les années 2000, la seule possibilité thérapeutique pour les formes métastatiques de CBNPC était représentée par la chimiothérapie. Depuis 2004, Lynch ouvre la voie aux thérapies ciblées en montrant que les carcinomes porteurs de mutations activatrices de l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), principalement des adénocarcinomes, sont sensibles aux inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) de l'EGFR (11). Ce constat finit par déboucher sur l'attribution en 2009 de l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en 1^{ère} ligne au gefitinib (ITK de l'EGFR) chez les patients atteints de CBNPC métastatiques mutés EGFR (12). Depuis d'autres thérapies ciblées et des nouveaux traitements de chimiothérapies et d'immunothérapie se sont vus attribués une AMM (Annexe 1) permettant aujourd'hui aux patients métastatiques d'avoir une survie prolongée et améliorée.

- En l'absence de mutation d'intérêt, la prise en charge repose sur une chimiothérapie à base de sels de platine ou sur une immunothérapie (pembrolizumab si PDL1 > 50%).
- En présence d'une altération actionnable d'EGFR, le traitement de référence est basé sur l'utilisation d'un ITK d'EGFR. Depuis mars 2020, il est recommandé de proposer un traitement de 1^{ère} ligne par osimertinib, un ITK d'EGFR de 3^{ème} génération ayant montré une amélioration significative de la survie sans progression et de la survie globale des patients par rapport aux ITK

de 1^{ère} génération dans l'essai FLAURA (13). L'ITK est alors maintenu jusqu'à progression de la maladie.

- En cas de progression sous ITK de l'EGFR de 1^{ère} ou 2^{ème} générations, une recherche de la mutation T790M sur ADN tumoral doit être réalisée. Sa détection permet de proposer un traitement de 2^{nde} ligne par osimertinib, indication initiale pour laquelle la molécule avait reçu une AMM complète en 2017 (14).
- En cas de progression sous osimertinib, un mécanisme de résistance ciblable doit être recherché sur ADN tumoral. En l'absence de thérapie ciblée alternative possible en 2^{ème} ligne, une chimiothérapie à base de sels de platine, obéissant aux mêmes règles qu'une 1^{ère} ligne chez les patients non mutés doit être entreprise en l'absence de contre-indication.

F. Cytogénétique et biologie moléculaire

Depuis l'émergence des thérapies ciblées suites aux travaux de Lynch en 2004 sur les mutations de l'EGFR actionnables par ITK, le génotypage des CBNPC non épidermoïdes, de stades avancés ou métastatiques devient une nécessité (11). Pour y répondre, l'Institut National du Cancer (INCa) s'est vu donner pour mission la structuration de 28 plateformes de biologie moléculaire à répartir équitablement sur le territoire français afin d'assurer l'accès à ce génotypage à tous les patients (15). D'autres missions lui sont confiées, comme la détection prospective et à grande échelle de biomarqueurs émergents pouvant être la cible de nouvelles thérapies ainsi que la mise en place d'un programme d'accès sécurisé à des thérapies ciblées innovantes (AcSé), lancé en 2013, visant à proposer à des patients en échec thérapeutique de nouvelles thérapies dans le cadre d'essai thérapeutique. Aujourd'hui, il est donc possible d'identifier une anomalie biologique ou mutation dans environ 50% des CBNPC, permettant d'envisager un traitement « à la carte » pour ces patients. Les principales mutations découvertes à ce jour concernent des récepteurs membranaires présents à la surface des cellules, comme des mutations de l'EGFR (10%), des mutations de KRAS (26,7%), un remaniement de ALK (3,9%), une amplification de MET (< 5%), une mutation de HER2 (1%), des mutations de BRAF (1,8%), des mutations ou une amplification de PIK3CA (2,4%) ou un remaniement de ROS1 (<1%). Actuellement, seules les altérations géniques EGFR, ALK et plus récemment ROS1 sont associées à la prescription de thérapies ciblées, validée par une AMM (16).

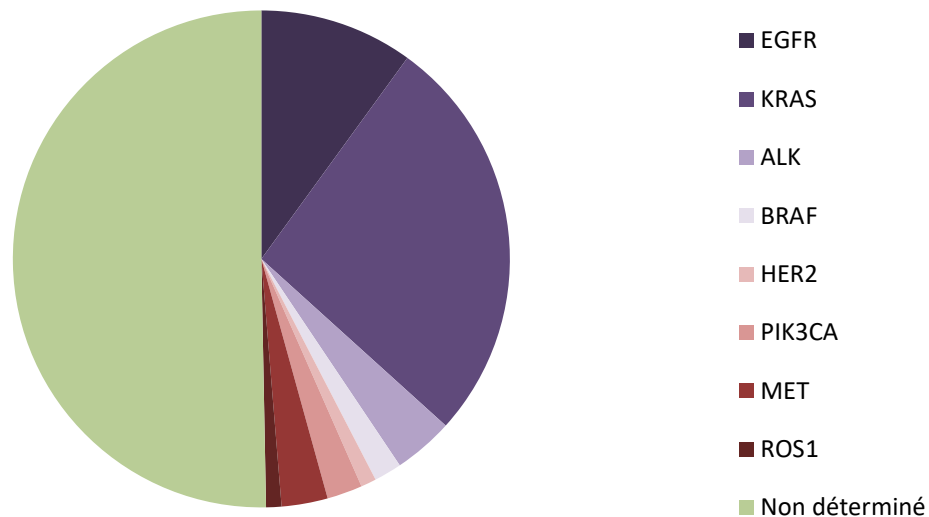


Figure 2. Proportion des anomalies géniques retrouvées dans les CBNPC d'après le rapport d'activité des plateformes de biologie moléculaire de l'INCa en 2012.

Il est important de préciser que les carcinomes épidermoïdes comportent un niveau très élevé d'altérations génomiques, supérieur aux autres classes de CBNPC. Toutefois, depuis la classification OMS de 2004, il n'a pas été mis en évidence de biomarqueurs prédictifs d'une réponse tumorale à un traitement spécifique. Les recommandations de l'INCa pour la recherche de mutation ou de translocation ne s'appliquent pas à cette catégorie tumorale excepté dans le contexte clinique particulier d'un patient jeune et ou non-fumeur (17).

Les mutations de l'EGFR font partie des variantes, actionnables par thérapies ciblées, les plus couramment détectées dans les CBNPC non épidermoïdes. Présentes chez 5% à 15% des patients européens, en fonction du sexe, du statut tabagique et du type histologique, trois types d'anomalies du gène de l'EGFR sont identifiables (18):

- les délétions dans l'exon 19 maintenant le cadre de lecture,
- les mutations ponctuelles faux sens dans les exons 18 à 21,
- et les duplications et/ou insertions dans l'exon 20 maintenant le cadre de lecture.

A noter que 85% des mutations de l'EGFR trouvées dans les CBNPC sont des délétions dans l'exon 19 et la mutation L858R, situées dans l'exon 21. La présence d'une mutation sensibilisante de l'EGFR indique généralement une forte probabilité de réponse aux ITK de l'EGFR.

Cependant la plupart des patients développeront une résistance aux ITK d'EGFR dans les 10 à 24 mois de traitement, liée à la sélection d'un clone tumoral porteur d'une mutation de résistance d'EGFR. À ce jour, trois mécanismes de résistance secondaire d'EGFR ont été identifiés. Environ 60% des patients sélectionnent un clone tumoral résistant en rapport avec une mutation T790 M dans l'exon 20 de l'EGFR qui se caractérise par un remplacement d'une thréonine par une méthionine au niveau du codon 790. Le changement de conformation de la protéine induit par la mutation T790M, empêche la fixation des inhibiteurs d'EGFR-TKi de 1^{ère} et 2^{ème} générations (19). L'osimertinib, ITK de 3^{ème} génération permet de passer outre cette résistance secondaire. Deux autres mutations de résistance d'EGFR, la mutation D761Y dans l'exon 19 et la mutation C797S dans l'exon 20 sélectionnée sous ITK de 3^{ème} génération, sont retrouvées de façon beaucoup plus rare.

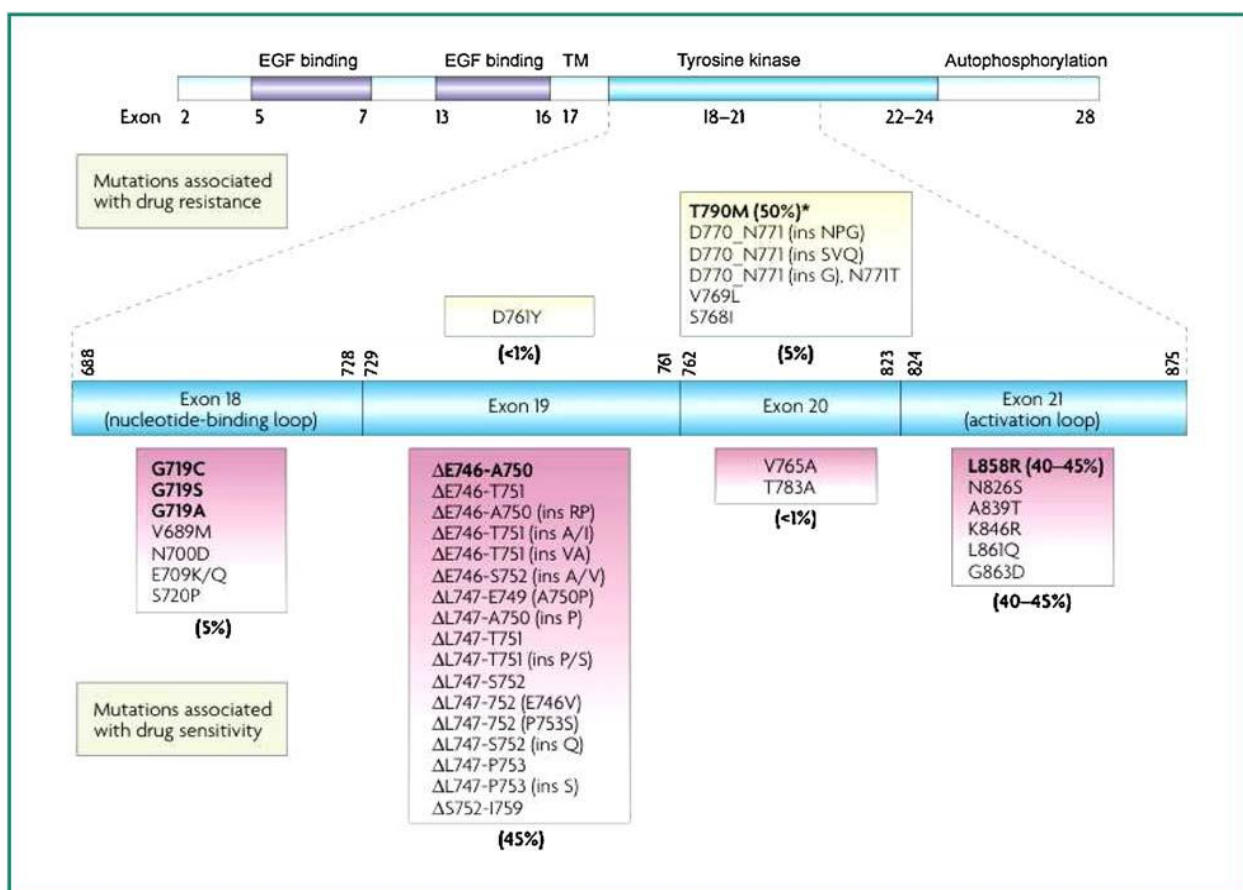


Figure 3. Les mutations oncogéniques de l'EGFR dans le cancer bronchique (20).

A noter que la mutation de résistance C797S dans l'exon 20 d'EGFR, découverte récemment chez des patients sous ITK de 3^{ème} génération (osimertinib) n'apparaît pas sur ce schéma datant de 2007.

G. Biopsie liquide

Le terme « biopsie liquide » est un terme « grand public » qui définit un « test effectué sur un échantillon de sang pour la recherche de fragments d'ADN ou de cellules cancéreuses provenant d'une tumeur et circulant dans le sang » selon l'INCa (21). Par extension, le concept de biopsie liquide est applicable à l'ensemble des fluides biologiques : liquide pleural, liquide d'ascite, liquide céphalo-rachidien, urines et salive. Ce simple geste « micro-invasif » permet d'obtenir et d'étudier des éléments du patrimoine tumoral. En effet, les tumeurs cancéreuses peuvent – à l'instar des tissus sains et/ou inflammatoires – relarguer du matériel tumoral dans la circulation sanguine. Schématiquement, la tumeur peut ainsi relarguer : des cellules tumorales « entières » vivantes (cellules tumorales circulantes), de l'ADN tumoral (ADN circulant), de l'ARN (micro-ARN et ARN messenger circulant) ou encore des protéines des cellules tumorales (Figure 4). Seul l'ADN tumoral circulant possède, à ce jour, des applications pratique en routine dans la prise en charge des patients atteints de CBNPC (22).

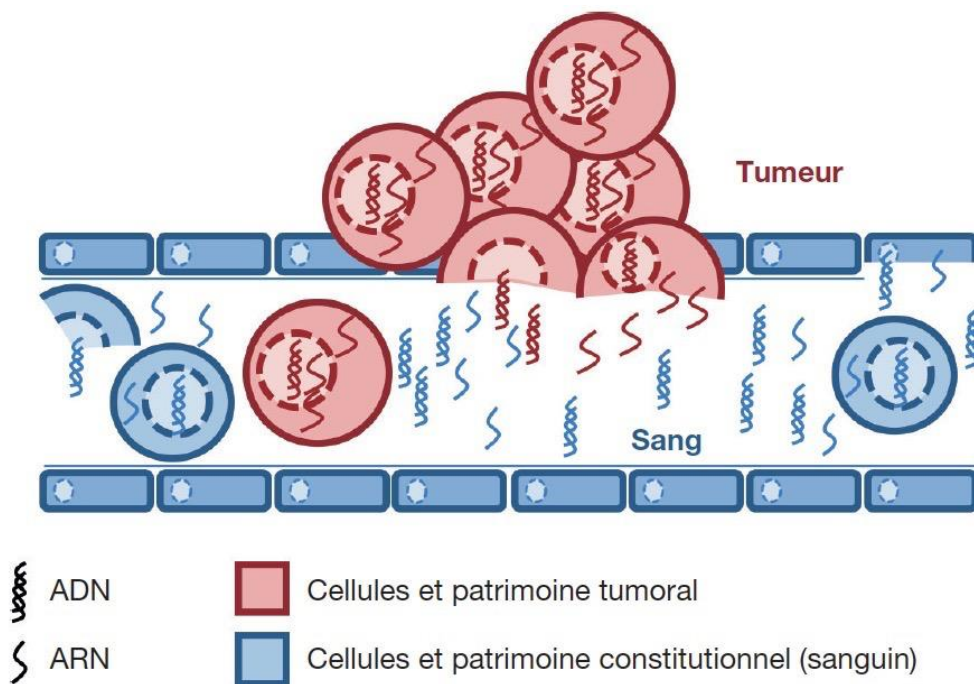


Figure 4. Illustration de l'issue de cellules tumorales circulantes, d'ADN et ARN circulant dans le sang.

Historiquement, Mandel et Metais ont détecté pour la première fois en 1946, de faible quantité d'ADN libre circulant (ADNIc) dans le sang de patients sains et malades (23). L'ADNIc se présente sous la forme

de fragments d'ADN double brin de petite taille (environ 150 paires de bases) circulant librement dans les fluides biologiques. Cet ADN provient de la nécrose ou de l'apoptose cellulaire, voire pour une petite partie de la sécrétion active des cellules. Ainsi l'ADNlc comprend inéluctablement une part d'ADN constitutionnelle qui peut provenir de l'apoptose de cellules normales et/ou des tissus inflammatoires ou traumatisés (chirurgie, brûlures...), de tumeurs bénignes, d'agent infectieux (bactéries, virus) ou encore du fœtus chez les femmes enceintes (24). C'est en 1977 que les travaux de Leon et Al démontrent que la concentration d'ADNlc est plus élevée chez les patients atteints de cancer et directement corrélée à la masse tumorale (25). Or, il est important de comprendre que seule la mise en évidence d'une mutation somatique connue pour être d'origine tumorale permet de distinguer l'ADN tumoral de l'ADN constitutionnel.

L'exploitation de l'ADNlc nécessite des techniques de biologie moléculaire particulièrement sensibles pour détecter quelques copies d'une mutation au sein de petites quantités d'ADNlc. Ce n'est que depuis quelques années que l'émergence et l'accès aux techniques de PCR digitale et de séquençage de nouvelle génération (NGS) ont permis une pratique fiable des analyses moléculaires sur ce type de matériel (26). Ainsi, ces deux techniques très sensibles, se caractérisent par des seuils de détection de l'ordre de 1 à 0,1 % soit la détection d'une copie mutée au sein de 1 000 copies sauvages. Si la PCR digitale a l'intérêt d'être une technique quantitative (nombre de copies par μ l), plus sensible et précise, elle ne permet de détecter seulement que les mutations déjà connues et ciblées (« hot spot »). Le NGS, bien que moins sensible, pallie à cette limite en effectuant de multiples recherches d'altération somatique en une analyse (multiplex), et d'avoir une vue d'ensemble du profil moléculaire du patient.

H. Contexte actuel et objectif de l'étude

La majorité des patients atteints de CBNPC sont diagnostiqués à un stade avancé de la maladie et ne sont pas opérables. L'accès à la tumeur par biopsie est parfois difficile et nécessite des examens invasifs chez des patients souvent fragiles présentant de nombreuses comorbidités. Les prélèvements tumoraux qui en résultent correspondent le plus souvent à des échantillons histologiques (voire cytologiques) de petite taille, le plus souvent insuffisant pour le nombre croissant d'analyses à réaliser dans le cadre d'une

prise en charge thérapeutique optimale (Annexe 5). Même si l'ADN extrait du tissu tumoral doit rester le matériel de référence pour l'évaluation du statut mutationnel d'EGFR, la mise en place de la BL comme test non invasif pour détecter les marqueurs génétiques tente déjà depuis quelques années de répondre à ce besoin devenu majeur en oncologie thoracique.

Ainsi, en 2016, les recommandations éditées par le groupe français de cyto-oncologie (GFCO) sur la base de discussions d'experts, ont proposé deux indications de la biopsie liquide font actuellement consensus en oncologie thoracique (27) :

- Au diagnostic histologique initial du CBNPC avec la recherche de mutation somatique lorsque le matériel tissulaire tumoral est insuffisant.
- En cas de progression tumorale sous traitement par TKI d'EGFR de 1ère ou 2^{ème} génération avec la recherche de la mutation de résistance T790M de l'exon 20 du gène d'EGFR.

L'objectif de cette étude rétrospective réalisée au sein du CHU de Dijon sur une période de 3 ans (septembre 2016 à décembre 2019) est de rendre compte de l'impact de la biopsie liquide dans la prise en charge des patients atteints de CBNPC métastatiques lors de la pratique clinique courante. Pour cela nous allons comparer le statut mutationnel d'EGFR dans les BL et les prélèvements tissulaires correspondants au moment du diagnostic et analyser les différents mécanismes de résistance détectés chez les patients progressseurs sous TKI d'EGFR.

II. Article

Contribution of liquid biopsy in the management of patients with Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer

Lisa Chassagne*, Benjamin Tournier ^x, George Tarris*, Alice Millière*, Selim Ramla*, Ossama Yacoub*, Lyse Marie Dubois ^x, Alicia Remond ^x, Pascal Foucher ^y, Caroline Chapusot ^x, Laurent Martin*.

From the Departments of Pathology*and Molecular biology ^x, Technical and biological center, François Mitterrand University Hospital, Dijon, France; The Department of Thoracic Oncology ^y, François Mitterrand University Hospital, Dijon, France.

Address correspondence to Lisa Chassagne, Technical and biological center, François Mitterrand University Hospital, 2, Rue Angélique Ducoudray, 21000 Dijon, France.

E-mail: lisa.chassagne@orange.fr

A. Abstract

This retrospective study, carried out at the Dijon University Hospital over 3 years, evaluates the contribution of liquid biopsy on the management of patients with metastatic non-small cell lung cancer at baseline and progression on treatment. 216 liquid biopsies taken from 175 patients were included. After extraction, the free circulating DNA was analyzed by digital PCR followed by new generation sequencing according to a pre-established protocol. In our study, actionable EGFR mutations was detected in 10 patients (9.1% out of 91 patients) with a diagnosis of non-small cell lung cancer including 2 on tissue only, in accordance with the literature data. T790M mutation of resistance was detected in only 10 patients (31.2% out of 32 patients) on TKI, including 1 in tissue only and 1 in LB only. Concordance between EGFR mutation status in the plasma and tumor tissue was 95.91% (Cohen's $\kappa = 0.77$,) at Baseline and 77% (Cohen's $\kappa = 0.5$) at progression on TKI. In conclusion, the combination of rapid ddPCR-based plasma genotyping assays with plasma NGS assays for more comprehensive noninvasive genotyping has enabled to guide clinicians to rapidly initiate targeted therapy or alternative therapies in case of insufficient or ineligible tissue sampling at baseline and a faster therapeutic switch by 3rd generation TKI in case of progression on TKI.

B. Introduction

In 2018, 46,363 new cases of lung cancer were diagnosed in metropolitan France, of which 70 to 75% were locally advanced or metastatic (1). While the treatment of reference in the early stages is surgery, in advanced stages cytotoxic chemotherapy was the rule. Since 2009, several anti-EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKI) have received a marketing authorization from government agencies, officially opening up an alternative therapeutic for patients with metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC) with actionable mutations in EGFR. EGFR mutations are some of the most common variants detected in NSCLC, present in 5% to 15% of cases depending on patient demographics and smoking status (28,29). Three types of EGFR gene abnormalities are actionable by TKI: deletions in exon 19 maintaining the reading frame, false sense point mutations in exons 18 to 21 and duplications and/or insertions in exon 20 maintaining the reading frame (17). 85% of mutations of EGFR found in NSCLCs are deletions in exon 19 and L858R mutation, located in exon 21 (30). The presence of a sensitizing EGFR mutation usually indicates a high likelihood of response to first generation TKI, but most patients will develop resistance within 10 to 24 months of treatment (31–33). DNA extracted from tumor tissue is the gold standard for the assessment of EGFR mutation but as the majority of patients are diagnosed at an advanced stage of the disease and are not operable. So, EGFR mutations are detected most often in biopsy samples. In this case, the amount of material available is limited and the percentage of tumor cells is also lower than on surgical specimens, leading to an increased risk of false negatives. Furthermore, obtaining tissue is invasive and a number of patients were poor candidates for biopsy due to comorbidities (34). Finally, the assessment of acquired resistance T790M mutation is not always easy because re-biopsy after initial therapy is sometimes challenging. "Liquid biopsies" (LB) are used to detect genomic alterations in cell-free circulating DNA (cfDNA). Usually performed on blood sample for the detection of DNA fragments or cancer cells originating from a tumor (21). LB is by extension, applicable to all biological fluids: pleural effusion, ascites, cerebrospinal fluid, urine and saliva. LB can be used for the detection of EGFR-mutations when tissue is not sufficient for molecular characterization. Several studies have demonstrated that plasma genotyping results are highly concordant with tissue genotyping (28,34–36). In addition to being minimally invasive, the assessment of ctDNA has the potential to overcome sampling bias due to spatial and temporal genetic heterogeneity of tumor samples that has been observed for NSCLC (37,38). Thus, in 2016, recommendations, edited by the French group of cyto-oncology (GFCO) based on expert

discussion, proposed determination of EGFR mutational status based on cfDNA in second intention at diagnostic, when tissue is not available, and in first intention for patient with progression under EGFR-TKIs therapy (27). The goals of this retrospective study carried out over a period of 3 years were 1) the comparison of the EGFR status in LB and tissue at baseline 2) the search for mutation of resistance in patients progressing on TKI in the context of clinical practice.

C. Materials and Methods

1. Study design and patients

This is a monocentric retrospective study conducted at the CHU of Dijon between September 2016 and December 2019. 216 LB taken from 175 patients were included in the study among the 352 LB analyzed in our laboratory. Most patients were followed up in our institution (80%). The inclusion criteria were at baseline suspicion or metastatic non squamous NSCLC and at progression treatment with anti-EGFR therapy. Non-contributory LB and external LB without medical information were excluded.

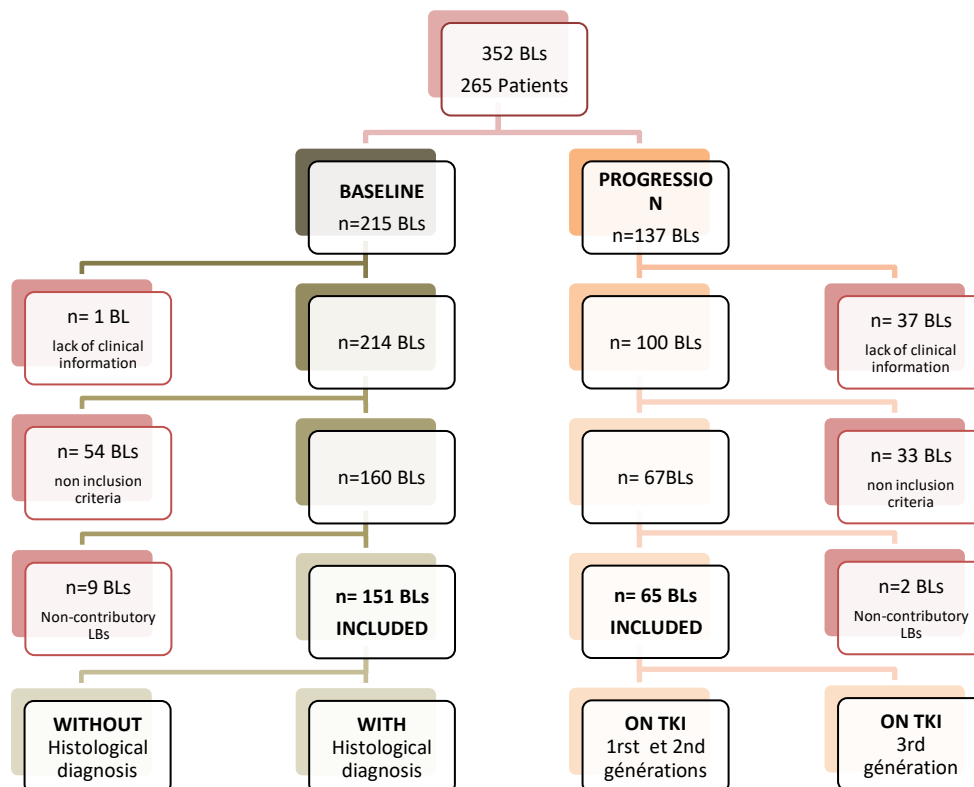


Figure 5. Flow chart of the retrospective study.

For each LB, the dates of sampling and registration, the cause of prescription, technique used, mutations identified, the existence of a concomitant tissue sample and the results of the molecular analyses were collected.

At baseline, 151 LB were collected from 141 patients: 52 LB from 50 patients suspected of NSCLC and 99 LB from patients with a histological or cytological diagnosis of NSCLC. At progression, 65 LBL were collected from 34 patients on TKI: 32 patients on first or second generation TKI (gefitinib, Erlotinib and Afatinib) and 2 patients with T790M mutation on third generation TKI (Osimertinib). Clinical, biological and radiological data retrospectively collected from computerized records were age, sex, histological diagnosis of the tumor and metastatic status. All patients had previously signed an informed consent allowing the use of their medical records.

2. Sample collection and processing

Venous blood was collected in four 7ml K2-EDTA tubes or three 9ml Roche® Cell-free DNA collection tubes. They were sent to our pre-analytical sector within 4 hours or 7 days respectively after collection. A first centrifugation for 10 minutes at 1400 g was carried out before storing the plasma samples at - 80°C. After a second centrifugation of 6 minutes at 16 000g and 6°C, the extraction of the cfDNA was carried out with the QIA Symphony (Quiagen®) automaton from 4mL of plasma. The quality of the extracted DNA was checked by the TapeStation 4200 (Agilent Technologies®) and its total concentration was evaluated by the Qubit method. The concentration of cfDNA varied between 0.19ng/μl and 60ng/μl.

3. EGFR Mutation and MET amplification analyses

EGFR mutation and MET amplification analyses using extracted cfDNA from plasma, were performed with the droplet digital PCR (ddPCR) (Crystal Digital, Naica system®, Stilla Technologies®). IDEGFR kit including nucleic acid matrix, primers, probe fluorescente, thermostable DNA polymerase, Mg²⁺, buffer mixed with patient's DNA (naica® multiplex PCR MIX 5X) was used according to the manufacturer's instruction. All techniques included a blank (nuclease-free water) and an in-house positive control. Data were analyzed using The Crystal Miner software (Stilla Technologies®). Theoretical analytical sensitivity of the Digital PCR-Naica System is 0.1% of variant allele detected in 10,000 copies of DNA/ml of extracted plasma. When the analytical sensitivity was more than 1%, the risk of undetected mutations was considered too high. Above this threshold, a new LB or tissue biopsy was recommended. The image acquisition step was performed using the Prism3 instrument and Crystal Reader software Digitale. Analysis was done using Crystal Miner software (v2.0.0) of the Naica system (Stilla Technologies).

EGFR genotyping in tissue was performed in 19 cases with a pyrosequencing method (therascreen EGFR Pyro Kit, Qiagen®) after DNA extraction carried out using a DNA extraction kit (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, Qiagen®). In 18 cases, EGFR mutations were detected by Idylla™ EGFR Mutation Test using a cartridge single-use in which the extracted DNA was placed directly then inserted in the Idylla™ system. In 21 cases, tissue genotyping was performed with illumina next-generation sequencing (NGS) systems (NextSeq, Illumina®) using the CAPTURE Solid Tumor Solution gene panel 42 genes - 21,404 bp (by Sophia genetics®). Briefly, after PCR amplification gDNA libraries were used for hybridization, and then sequenced on Illumina Platform (Next 550).

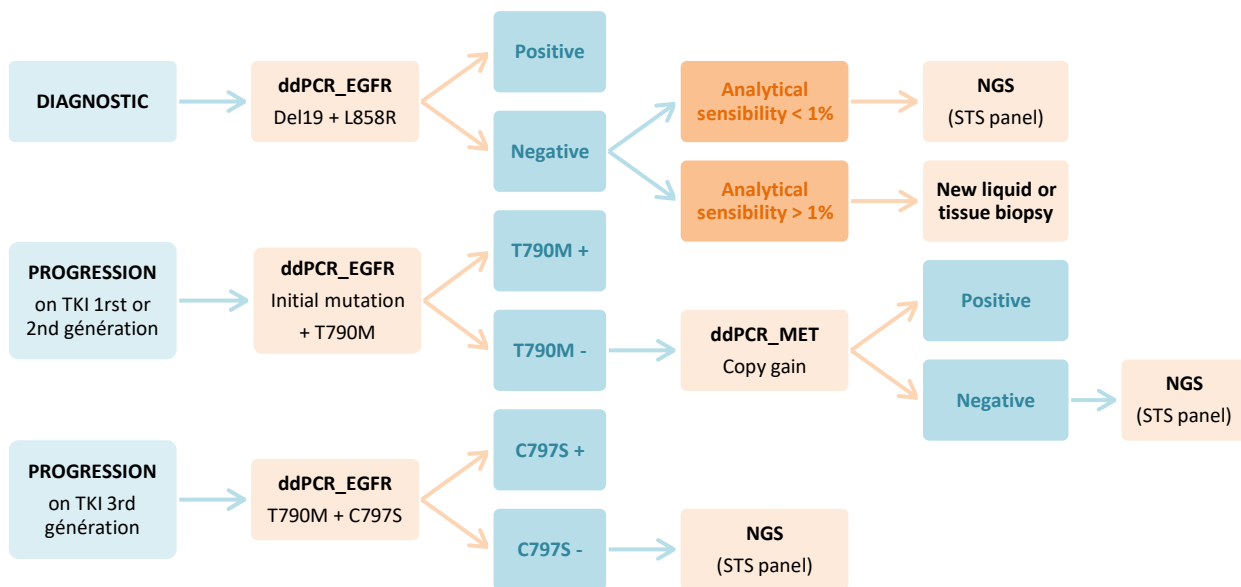


Figure 6. Decision tree analysis.

The protocol of analysis depended on the timeline of the prescription of LB. At baseline, activating mutations of exons 19 and 21 of the EGFR were systematically detected by ddPCR. In negative case with an analytical sensitivity higher than 1%, a NGS study was performed; otherwise a new liquid or tissue biopsy was requested. At progression on TKI, the T790M or C797S resistance mutations and a copy gain of MET gene were targeted first by ddPCR. If negative, other mechanisms of resistance were carried out by NGS.

D. Results

1. Patient's characteristics

Table 1 shows a detailed view of patient's characteristics.

Characteristics	BASELINE n = 141	PROGRESSION n= 34
Clinical characteristics		
Median age, [extreme] years	77 [27-97]	72 [37-93]
Male sex, n (%)	66 (46.8%)	10 (29.5 %)
Disease stage at LB		
I ^a	15	-
II ^a	1	-
III	10	-
IV	97	34
No information	18	-
Number of extra-thoracic metastases		
0	44	5
1	49	13
≥ 2	28	16
No information	18	-
Treatment		
No TKI	141	-
Erlotinib	-	6
Gefitinib	-	3
Afatinib	-	23
Osimertinib	-	2
Number of LB per patient		
1	131	15
2	10	15
≥ 3	-	4
Type of LB		
Blood	137	32
Pleural fluid	2	-
Both	2	1
Cerebrospinal fluid	-	-
Both	-	1
Histological type		
Adenocarcinoma	68	32
Large cell carcinoma	3	-
Sarcomatoid carcinoma	1	-
NSCLPC	19	2
No histology	50	-
Prescribers of BL		
Pneumologists	21	3
Oncologists	93	29
Geriatrics	16	1
Others	11	1

Table 2. Patient's characteristics.

Qualitative variables are reported as number and percentage. ^aPatients with localized NSCLC (stage I and II) correspond to patients not eligible for surgery or invasive diagnostic procedures.

At baseline, LB were performed 21 days (median, range, 0 to 1752 days) after or before histological diagnosis. Anatomic sites of tissue sampling included lung (67%), pleura (12%), and other metastatic sites (21%). At progression, LB were performed 632 days (median, range 126 to 3555 days) after the initial histological diagnosis. Only 9 patients (26.5%) underwent tissue re-biopsy for suspected progression on TKI. Anatomic sites of tissue re-biopsy included lung (50%), pleura (25%), and other metastatic sites (25%). At baseline, a tissue sample was available for 91 patients. EGFR sequencing analysis was informative in 46 cases (51.6%). EGFR sequencing was not informative in 45 cases because the percentage of tumor cells or the quantity or quality of yielded DNA was insufficient. At progression, EGFR sequencing was informative in the 9 patients on TKI who underwent re-biopsy. The turnaround time for LB, shown in table 3 was optimised over the last few years with a median delay of 5 days from registration in 2019 (Annexe 5).

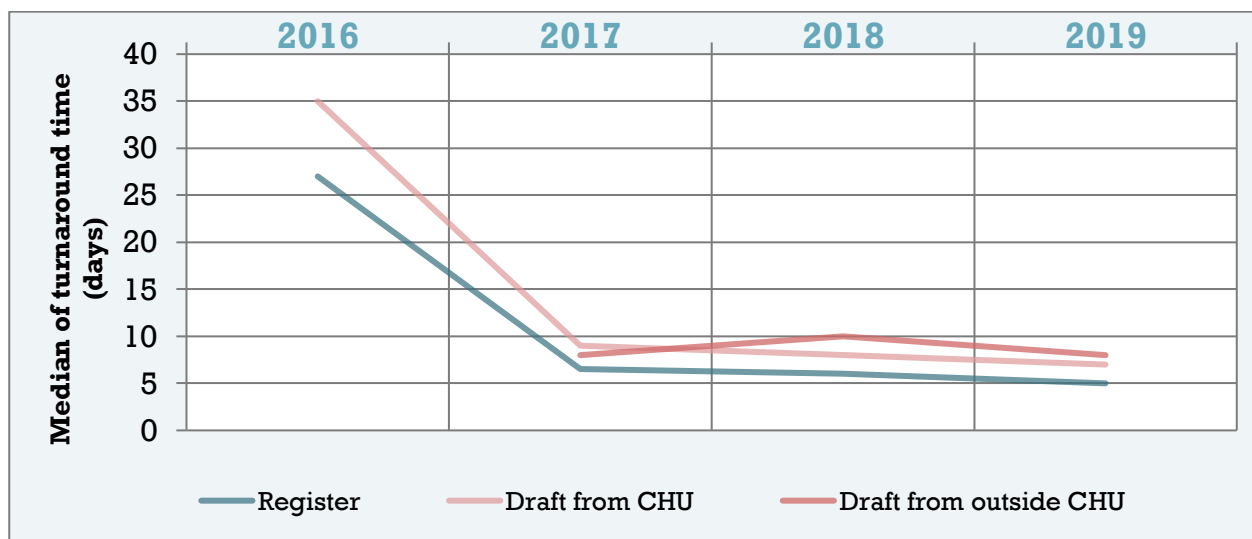


Figure 7. Median's evolution of turnaround time from 2016 at 2019.

Since the introduction of the digital PCR technique (Naica, Stilla®) in our department in September 2016, the search for EGFR gene mutations in the plasma of patients with metastatic NSCLC has been rapidly included in the laboratory's routine techniques. Within a year of practice and with the increasing demand for liquid biopsy analysis, two runs of ddPCR were initiated per week. 20 liquid biopsies could be analysed per run or a total of 40 patients per week.

2. EGFR mutation in LB of patients with suspected NSCLC

LB was performed in 50 patients with clinical and radiological suspicion of lung cancer. They were mainly elderly people (median 91, range 78 to 97 years) for whom all therapeutic investigations and treatment

(chemotherapy or surgery) were not possible (patient's or physician's decision). EGFR exon 19 deletions were more frequently reported than L858R mutations, respectively in 4 (8%) and 3 (6%) patients. EGFR exon 20 mutation was detected in only one (2%) patient. Four patients benefited from TKI. Two other patients preferred palliative care and the 2 latest died. Among 39 patients without del19 or L858R mutation detected by ddPCR, 29 were tested by NGS. Two mutations of KRAS, 1 mutation of TP53, 1 mutation of MET were detected by NGS.

3. EGFR mutation in LB of patients with Metastatic NSCLC at baseline

LB was performed in 91 patients with a diagnosis of NSCLC. EGFR Exon 19 deletions were detected in 4 (4.4%) patients and L858R mutations in 4 (4.4%) patients. Among 70 patients without del19 or L858R mutation detected by ddPCR, 37 were tested by NGS. Nine mutations of KRAS, 1 mutation of TP53, 3 mutations of MET and 2 mutations of BRAF were detected by NGS.

4. EGFR mutation in LB of patients with progression on TKI

Sixty-five LB were collected from 32 patients on first-line TKI with clinical or radiological progression in order to detect the T790M mutation of EGFR. Overall, 9 T790M mutations were detected (8 patients on Afatinib, 1 patient on Erlotinib) after a median of 14 months of treatment (range, 4 to 29 months). No C797S mutation was found in the 2 patients on 3rd generation TKI (Osimertinib). MET amplification known as a resistance mechanism, was sought in all patients on TKI. Only one copy gain of MET was identified. An NGS analysis was carried out in 25 patients without identified mechanisms of resistance. TP53 mutations were detected in 5 cases. No mechanisms of resistance were found in the 19 latest patients (56%).

5. Concordance between Tumor Tissue and Liquid Biopsy

To determine the sensitivity of LB at baseline, we compared the result of EGFR in LB and tissue of 49 patients. EGFR mutations detected in 3 LB (6%) were also present in the tumor. In 2 cases (4%), mutations present in the tumors were not detected in LB, yielding a sensitivity of 60%. EGFR mutations were not detected in LB of 44 EGFR wild-type tumors, yielding an uncorrected specificity of 100 %.

Concordance between EGFR mutation status in the plasma and tumor tissue was 95.91%, and the agreement was highly significant (Cohen's K= 0.77).

At progression, concordance was based on data of the 9 patients with simultaneous LB and tissue re-biopsy. For each case, we determined whether T790M mutation of EGFR, was present in either tissue or LB. Sensitivity was 66.5% and specificity was 83.3% and overall agreement was moderate with a concordance of 77% (Cohen's K= 0.5).

Mutations	BASELINE n = 49	PROGRESSION n= 9
Matched results		
Positive	3 (6, 1%)	2 (22, 3%)
Negative	44 (89.8%)	5 (55, 5 %)
Mismatched results		
Positive LB	0	1 (11, 1%)
Positive Tissue	2 (4, 1%)	1 (11, 1%)

Table 3. Paired analysis at baseline and progression on TKI.

Results were considered concordant when mutations detected in the biopsy and LB analysis were the same (1 L858R, 2 del19, 5 KRAS, 2 MET and 2 BRAF). One mutation of exon 18 of EGFR, one del19 of EGFR, 4 mutations of KRAS and one amplification of HER2 were detected only in the biopsy. The concordance at progression was done only for T790M.

E. Discussion

Over the last decade, numerous targeted therapies have been developed to treat NSCLC. New genetic markers, predictive of sensitivity or resistance to such therapies have been highlighted. Targeted therapies using TKI have led to an increase of progression-free survival and response rate for a subgroup of NSCLC patients harbouring specific gene abnormalities. The characterization of these markers now makes it possible to propose personalized treatments for patients. Thus, the development of noninvasive methods to detect genetic markers has become a major challenge in oncology. The basic principle of LB was first described in 1869 by an Australian physician, Thomas Ashworth who described circulating tumor cells in post-mortem blood samples (39). The main challenge in the exploitation of LB has been for a long time the detection of mutated circulating DNA. Mutated circulating DNA are small fragments and represent a low proportion of total cfDNA. In addition, analyse of LB requires highly sensitive techniques that permit the detection of altered sequences within a high background of non-altered sequences liberated from normal cells (40). Identification and quantification of variations of DNA are generally

achieved with the use of polymerase chain reaction (PCR). This method is generally central to genetic testing but presents various limitations including preferential amplification of small fragments, and difficulty in detecting low abundance or poorly represented sequences (26). In addition, analysis of a complex DNA mixture by bulk PCR-based technologies leads to an averaged signal. Moreover, these global analyses show a very low sensitivity for the detection of rare sequences within complex DNA mixtures such as those extracted from biological samples. Such limitations could be overcome with the use of ddPCR where each target DNA molecule is isolated within individual compartment prior to PCR amplification. Incorporation of technologies that reduce background input from DNA from nonmalignant cells has improved sensitivity of plasma genotyping assays. Thus, genotyping with ddPCR, a method that distributes genetic material into thousands of individual PCR reactions, uses compartmentalization to decrease background noise allowing the detection of 1 mutant allele among 10,000 or more wild-type alleles. The single DNA molecule amplification achieved through microfluidic chips or emulsification significantly increases sensitivity for detecting genomic alterations. ddPCR involves partition of target DNA templates into water in oil emulsion followed by PCR amplification and end-point quantification of amplified partitions using fluorescent signal, showing high specificity and sensitivity for detecting and quantifying cancer mutations (24,41). To our knowledge, Crystal Digital PCR is the first ddPCR platform which enables multiplex detection of targets in 3 independent fluorescent channels with major advantages of its enhancing sensitivity and higher multiplex capacity.

In our study, EGFR mutations were detected in 10 patients (9.1% out of 91 patients) with NSCLC. This figure is conformed with the one reported in the literature (42).

Concordance between EGFR mutation status in the plasma and tumor tissue was 95.91% (Cohen's $\kappa = 0.77$), at Baseline and 77% (Cohen's $\kappa = 0.5$) at progression on TKI, leading respectively to 60% and 66.5% of sensitivity and 100% and 85.3% of specificity in accordance with the results of the metanalysis of Qiu et al (43). Nevertheless, EGFR mutation was detected in the tissue but not in the plasma in 2 cases (4%) at baseline and in 1 case (11%) at progression, indicating that tumor ctDNA shedding into the circulation was limited or that EGFR mutation was present but below the limit of detection (LOD) in the plasma. These observations support the added value of diagnostic strategies combining LB with tumor tissue for EGFR testing in LB negative cases as described in one study (44). Furthermore,

combination strategies associating LB followed by tumor tissue DNA analyses in LB negative cases were cheaper compared with the current clinical practice, that is, a tissue-only mutation analysis. Altogether, a stepwise combination of LB and tumor tissue EGFR mutation status would likely lower the overall costs of diagnostic testing as well as health care costs by making a better selection of putative anti-EGFR responders (45).

At progression on TKI, the detection of the mutation of resistance in LB indicates that tumor cells are dying, even if they are resistant to therapy. Diaz et al. reported that tumor cells die almost as frequently as they divide explaining the detection of T790M mutation in LB (46). In our study, T790M mutation was detected in LB but not in the tissue of one patient with multiple metastatic sites. Tumor heterogeneity might explain this discordance even if these are rare events (35). This patient was a septuagenarian subject with metastatic NSCLC who had developed acquired resistance to afatinib with painful bone, abdominal and cerebral metastases. Due to the patient's age and comorbidities, significant concerns existed about the risks of a biopsy and further systemic therapy. Plasma was drawn on the day of the visit and within 9 days ddPCR demonstrated 6,45 copies EGFR T790M /mL of plasma. A third-generation EGFR kinase inhibitor, osimertinib, was subsequently initiated and the patient had a response to therapy which was maintained for over 4 months. Our turnaround time of 5-8 days for BL contrasts sharply with the time taken to obtain genotyping on tumor tissue, which can take up to 1 month. This long turnaround time is largely due to the practical reality that histological diagnosis and genotyping are performed on increasingly smaller specimens. Newer endoscopy techniques with mini-probe ultrasound tracking allow access to more distal tumors but generally provide small, crushed, poorly cellular specimens. As a consequence, a second tissue biopsy at baseline is often required for molecular analysis, prolonging the wait for genetic results. The potential of LB to avoid re-biopsy in patients with acquired resistance is also considerable. Thus, LB allowed an early and rapid search for T790M in 71.87 % of our cases without the need of a re-biopsy. However, in our study, the T790M resistance mutation was detected in only 10 TKI patients (31.2%), which is inconsistent with literature data suggesting that 60% of patients on EGFR TKIs will develop a T790M mutation. This lower result can be explained by the fact that only one LB was performed in 44% of TKI patients. Indeed, in 4 cases, the identification of the T790M mutation needed several LB (2 LB in 3 cases and 4 LB in one case). So, LB in patient on TKI can avoid re-biopsy at the condition that several LB are performed.

In addition to the detection of targetable alterations, the identification of oncogenic drivers such as KRAS mutations that preclude the presence of other targetable alterations may guide the clinician to alternative therapies such as chemotherapy or immunotherapy. Primary resistance to TKI include mutations in KRAS, PI3K, loss of PTEN and activation of IGFR1. Secondary resistance to TKIs corresponds in the vast majority of cases (50-60%) to the T790M mutation that alters the conformation of the EGF receptor. In 20% of cases, resistance is due to the amplification of c-MET. HER2 or EGFR amplification, loss of PTEN, activation of IGFR1 may be a mechanism of secondary resistance in the remaining cases (47). In our study, we were unable to detect a resistance mechanism in 19 (55%) of our TKI patients. However, although this result is consistent with the literature, our NGS panel did not include several genes known to be potential candidates for resistance (PTEN, IGFR1). With the positioning of osimertinib as a first-line therapy since March 2021, we can speculate that the T790M mutation of resistance might disappear in favour of other mechanisms of resistance, such as the new EGFR resistance mutation C797S or MET or HER2 amplifications. The analysis of resistance on TKI should however follow the same logic, i.e. LB allowing genotyping either targeted to EGFR or ideally by NGS to cover more mechanisms and a tissue biopsy in case of negative test.

Interestingly, the evaluation of EGFR mutation by LB only in 50 non operable frail patients enabled the identification of 8 mutations of EGFR (16%) and the possibility to initiate less aggressive treatment.

F. Conclusion

In conclusion, this study showed that the combination of ddPCR-based plasma genotyping assays with plasma NGS assays for more comprehensive noninvasive genotyping has enabled to guide clinicians to rapidly initiate targeted therapy or alternative therapies in case of insufficient or ineligible tissue sampling at baseline. At progression on TKI, LB can avoid re-biopsy in patients with acquired resistance and in fine a faster therapeutic switch on condition that LB are repeated.

THESE SOUTENUE PAR Mme Lisa CHASSAGNE

CONCLUSIONS

Ce travail montre que la recherche, par PCR digitale et technique de séquençage haut débit, de mutations actionnables d'EGFR dans le plasma de patients atteints de cancer du poumon métastatique permet un génotypage exhaustif au diagnostic notamment quand la quantité de tissu est insuffisante ou la biopsie impossible et à progression sous TKI l'identification de mécanismes (mutation ou amplification) de résistance. A la progression sous TKI, la biopsie liquide peut éviter une nouvelle biopsie et une modification plus rapide du traitement à condition qu'elle soit répétée plusieurs fois.

Le Président du jury,



Pr. L. MARTIN

Vu et permis d'imprimer
Dijon, le 3 Juin 2021
Le Doyen



Pr. M. MAYNADIE

III. Bibliographie

1. Defossez G, Le Guyader-Peyrou S, Uhry Z, Grosclaude P, Colonna M, Dantony E, et al. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Synthèse. Saint-Maurice : Santé publique France, 2019. 20 p. Disponible à partir des URL : <http://www.santepubliquefrance.fr/> ; <https://geodes.santepubliquefrance.fr/#c=home> ; <http://lesdonnees.e-cancer.fr/> ; <https://www.e-cancer.fr/>.
2. Risque tabagisme passif, tabac, cancer du poumon, cancer du fumeur, tumeur de la plèvre | Cancer et environnement [Internet]. [cité 28 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.cancer-environnement.fr/267-Tabac.ce.aspx>
3. Amiante. Effets sur la santé - Risques - INRS [Internet]. [cité 28 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.inrs.fr/risques/amiante/effets-sante.html>
4. Wild P., Bourgkard E., Paris C. Cancer du poumon et exposition professionnelle aux métaux : une revue des études épidémiologiques-INRS. juin 2008 [cité 28 mai 2021];(129). Disponible sur: <https://www.inrs.fr>
5. Baysson H, Tirmarche M, Tymen G, Gouva S, Caillaud D, Artus JC, et al. Exposition domestique au radon et risque de cancer du poumon. Rev Mal Respir. sept 2005;22(4):587-94.
6. Trédaniel J, Aarab-Terrisse S, Teixeira L, Savinelli F, Fraboulet S, Gossot D, et al. Pollution atmosphérique et cancer bronchique : données épidémiologiques. Rev Mal Respir. avr 2009;26(4):437-45.
7. Collège des enseignants de pneumologie, Marquette C-H. Pneumologie: référentiel pour la préparation de l'ECN-Item 309 : Tumeurs du poumon, primitives et secondaires. Milon-la-Chapelle (Yvelines): S Editions; 2019.
8. Wheeler PR. Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheeler. 2015.
9. Travis WD, Weltgesundheitsorganisation, International Agency for Research on Cancer, éditeurs. WHO classification of tumours of lung, pleura, thymus and heart: ... reflects the views of a working group that convened for a consensus and editorial meeting at the International Agency for Research on Cancer, Lyon, April 24 - 26, 2014. 4. ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2015. 412 p. (World Health Organization Classification of tumours).
10. Couraud PS. Référentiels Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique. 2020;73.
11. 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.
12. HAS. Avis de la commission de la Transparence du 4 novembre 2009 pour la spécialité IRESSA. [Internet]. [cité 28 mai 2021]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2009-11/iressa_-_ct-6839_2009-11-30_10-32-47_442.pdf
13. HAS. Avis de la commission de la Transparence du 20 mars 2020 pour la spécialité TAGRISSO. [Internet]. [cité 28 mai 2021]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-18220_TAGRISSO_PIC_EI_AvisDef_CT18220.pdf
14. HAS. Avis de la commission de la Transparence du 21 septembre 2016 pour la spécialité TAGRISSO. [Internet]. [cité 28 mai 2021]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-15996_TAGRISSO_PIC_REEV_Avis3_CT15996.pdf
15. Mutations EGFR dans le cancer du poumon HAS.pdf.
16. Synthese-activite-plateformes-hospitalieres-genetique-moleculaire-en-2012-2014.pdf.
17. ©Mutations de l'EGFR dans le cancer du poumon : mise en évidence d'une cible moléculaire permettant un accès spécifique aux thérapies ciblées, INCa, Boulogne-Billancourt, février 2010.
18. Shigematsu H, Gazdar AF. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. Int J Cancer. 15 janv 2006;118(2):257-62.
19. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, et al.

Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Sci Transl Med*. 23 mars 2011;3(75):75ra26-75ra26.

20. 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.

21. Définition de la biopsie liquide - Dictionnaire NCI des termes du cancer - National Cancer Institute [Internet]. 2011 [cité 14 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/liquid-biopsy>

22. Guibert N, Garcia J, Couraud S. Quel avenir pour les biopsies liquides en oncologie thoracique ? *Rev Mal Respir Actual*. oct 2019;11(3):436-43.

23. Mandel P, Metais P. Nuclear Acids In Human Blood Plasma. *C R Seances Soc Biol Fil*. févr 1948;142(3-4):241-3.

24. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*. août 2013;10(8):472-84.

25. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. mars 1977;37(3):646-50.

26. Quan P-L, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: A Technology Review. *Sensors*. 20 avr 2018;18(4):1271.

27. Lemoine A, Couraud S, Fina F, Lantuejoul S, Lamy P-J, Denis M, et al. Recommendations by the GFCO for the diagnostic use of somatic genetic analyses of circulating tumour DNA. 2016;2:8.

28. 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.

29. Barlesi F, Mazieres J, Merlio J-P, Debieuvre D, Mosser J, Lena H, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *The Lancet*. avr 2016;387(10026):1415-26.

30. Ruppert A-M, Wislez M, Poulot V, Lacave R, Antoine M, Cadranet J. Un regard simple sur la biologie du cancer bronchique : EGFR. *Rev Mal Respir*. avr 2011;28(4):565-77.

31. Arcila ME, Oxnard GR, Nafa K, Riely GJ, Solomon SB, Zakowski MF, et al. Rebiopsy of Lung Cancer Patients with Acquired Resistance to EGFR Inhibitors and Enhanced Detection of the T790M Mutation Using a Locked Nucleic Acid-Based Assay. *Clin Cancer Res*. 1 mars 2011;17(5):1169-80.

32. Sequist LV, Yang JC-H, Yamamoto N, O'Byrne K, Hirsh V, Mok T, et al. Phase III Study of Afatinib or Cisplatin Plus Pemetrexed in Patients With Metastatic Lung Adenocarcinoma With *EGFR* Mutations. *J Clin Oncol*. 20 sept 2013;31(27):3327-34.

33. 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.

34. Douillard J-Y, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, Cole R, McWalter G, et al. Gefitinib Treatment in EGFR Mutated Caucasian NSCLC: Circulating-Free Tumor DNA as a Surrogate for Determination of EGFR Status. *J Thorac Oncol*. sept 2014;9(9):1345-53.

35. Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg SE, Alden RS, O'Connell A, Feeney N, et al. Prospective Validation of Rapid Plasma Genotyping for the Detection of *EGFR* and *KRAS* Mutations in Advanced Lung Cancer. *JAMA Oncol*. 1 août 2016;2(8):1014.

36. Thompson JC, Yee SS, Troxel AB, Savitch SL, Fan R, Balli D, et al. Detection of Therapeutically Targetable Driver and Resistance Mutations in Lung Cancer Patients by Next-Generation Sequencing of Cell-Free Circulating Tumor DNA. *Clin Cancer Res*. 1 déc 2016;22(23):5772-82.

37. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, et al. Intratumor

- Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. 2016;15.
38. Piotrowska Z, Niederst MJ, Karlovich CA, Wakelee HA, Neal JW, Mino-Kenudson M, et al. Heterogeneity Underlies the Emergence of EGFR T790 Wild-Type Clones Following Treatment of T790M-Positive Cancers with a Third Generation EGFR Inhibitor. 2016;22.
 39. Ashworth TR. Un cas de cancer dans lequel des cellules similaires à celles des tumeurs ont été observées dans le sang après la mort. *Journal médical australasien*. 1869;146-7.
 40. 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.
 41. Hudecova I. Digital PCR analysis of circulating nucleic acids. *Clin Biochem*. oct 2015;48(15):948-56.
 42. Barlesi F, Mazieres J, Merlio J-P, Debieuvre D, Mosser J, Lena H, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet Lond Engl*. 2 avr 2016;387(10026):1415-26.
 43. Qiu M, Wang J, Xu Y, Ding X, Li M, Jiang F, et al. Detection of EGFR Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-analysis. *Cancer Epidemiol*. :8.
 44. van 't Erve I, Greuter MJE, Bolhuis K, Vessies DCL, Leal A, Vink GR, et al. Diagnostic Strategies toward Clinical Implementation of Liquid Biopsy RAS/BRAF Circulating Tumor DNA Analyses in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *J Mol Diagn*. déc 2020;22(12):1430-7.
 45. van 't Erve I, Greuter MJE, Bolhuis K, Vessies DCL, Leal A, Vink GR, et al. Diagnostic Strategies toward Clinical Implementation of Liquid Biopsy RAS/BRAF Circulating Tumor DNA Analyses in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *J Mol Diagn*. déc 2020;22(12):1430-7.
 46. Diaz LA, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*. 28 juin 2012;486(7404):537-40.
 47. Barlesi F. [Management of patients with resistance to EGFR-TKI]. *Rev Pneumol Clin*. juin 2011;67 Suppl 1:S30-35.

IV. Annexes

Annexe 1. Thérapies ciblées mises sur le marché depuis 2009 dans le cadre des CBNPC localement avancés ou métastatiques porteurs d'anomalies moléculaires.

DATE AMM	TKI (DCI)	NOM COMMERCIAL	STRATEGIE THERAPEUTIQUE	INDICATIONS
24 juin 2009	GEFITINIB	IRESSA	1ère ligne	Mutation activatrice de l'EGFR.
6 juin 2012	ERLOTINIB	TARCEVA	1ère ligne	Mutation activatrice de l'EGFR.
25 sept. 2013	AFATINIB	GIOTRIF	1ère ligne	Mutation activatrice de l'EGFR.
2 février 2016	OSIMERTINIB	TAGRISSE	2ème ligne	Mutation de résistance T790M d'EGFR
20 mars 2020	OSIMERTINIB	TAGRISSE	1ère ligne	Mutation activatrice de l'EGFR.
23 octobre 2012	CRIZOTINIB	XALKORI	2ème ligne (SMR modéré) 1ère ligne (SMR faible)	Réarrangement d'ALK.
6 mai 2015	CÉRITINIB	ZYKADIA	2ème ligne	Réarrangement d'ALK.
23 juin 2017	CÉRITINIB	ZYKADIA	1ère ligne	Réarrangement d'ALK.
25 août 2016	CRIZOTINIB	XALKORI	2ème ligne (SMR modéré) 1ère ligne (SMR faible)	Réarrangement de ROS1.
27/29 mars 2017	DABRAFENIB TRAMETINIB	TAFINLAR MEKINIST	avis négatif en 2018. De nouveau remboursé depuis janvier 2020	Mutation BRAF V600E/K

Annexe 2. CAPTURE Solid Tumor Solution gene panel (Sophia genetics®).

Liste des genes sequences : AKT1 (3), ALK (21-25), BRAF (11,15), CDK4 (2), CDKN2A (1*,2,3), CTNNB1 (3), DDR2 (17), DICER1 (24,25), EGFR (18-21), ERBB2 (8,17,20), ERBB4 (10,12), FBXW7 (8-12), FGFR1 (12,14), FGFR2 (7,12,14), FGFR3 (7,9,14,16), FOXL2 (1*),GNA11 (4,5), GNAQ (4,5), GNAS (8), H3F3A(2*), H3F3B (2*), HIST1H3B (1),HRAS (2-4), IDH1 (4), IDH2 (4), KIT (8-11,13,17,18), KRAS (2-4), MAP2K1 (2,3),MET (2,14-20) large deletion, MYOD1 (1), NRAS (2-4), PDGFRA (12,14,18), PIK3CA (2*,3,6*,8,10,21),PTPN11 (3), RAC1 (3), RAF1 (7,10,12,13*,14*,15*), RET (11,13,15,16), ROS1 (38*,41*),SF3B1 (15-17), SMAD4 (8-12), TERT (promoteur*(mutations C228T et C250T),1*,8*,9*,13*), TP53 (2-11) *seulement les ' hotspots 'a mutationnels.

Liste des genes avec évaluation du nombre de copies: ALK, BRAF, CDK4, CDKN2A, EGFR, ERBB2, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, HRAS, KIT, KRAS, MET, MYOD1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, RAF1, ROS1, RET, SF3B1, TERT and TP53.

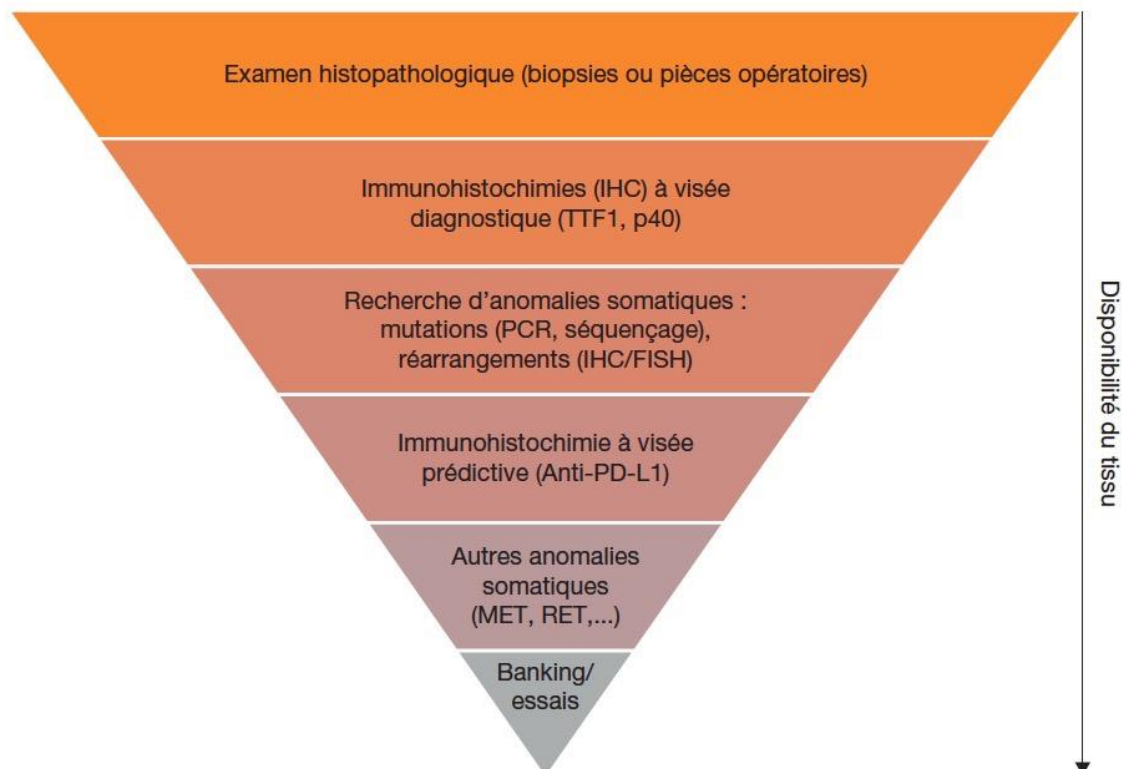
Annexe 3. 8^{ème} classification TNM du cancer du poumon (d'après (3)).

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

Annexe 4. Classification du cancer du poumon en stade clinique (d'après (4))

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

Annexe 5. Schématisation des analyses possiblement nécessaires sur prélèvement de tissu tumoral pour une prise en charge thérapeutique optimale d'un CBNPC.



Annexe 6. Evolution from 2016 to 2019 of turnaround time from registration and from venous samples.

RESPONSE TIME	2016	2017	2018	2019
From registration	13 LB	54 LB	82 BL	67 BL
Average (days)	36.76	9.12	6.91	6.56
Median (days)	27	6.5	6	5
range (days)	[4- 97]	[0- 89]	[0-21]	[0-31]
From venous samples (inpatient)	13 LB	47 LB	58 BL	55 BL
Average (days)	42.61	12.59	9.50	8.83
Median (days)	35	9	8	7
range (days)	[7-97]	[2-92]	[2-22]	[1-34]
From venous samples (outpatient)	0	7 LB	24 BL	12 BL
Average (days)	-	7.57	11.56	9.58
Median (days)	-	8	10	8
range (days)	-	[4-9]	[6-22]	[3-16]

Titre de la thèse : Contribution de la biopsie liquide dans la prise en charge des patients atteints de cancer pulmonaire métastatique non à petites cellules.

Auteur : Lisa Chassagne

RESUME :

Introduction : Cette étude rétrospective, réalisée au CHU de Dijon sur 3 ans, évalue l'apport de la biopsie liquide (BL) sur la prise en charge des patients atteints de cancer du poumon métastatique non à petites cellules au diagnostic et à la progression sous thérapie ciblée.

Matériel et méthodes : 216 biopsies liquides prélevées chez 175 patients ont été incluses. Après extraction, l'ADN libre circulant a été analysé par PCR digitale (dPCR) suivie d'un séquençage de nouvelle génération (NGS) selon un protocole pré-établi.

Résultats : Dans notre étude, des mutations actionnables de l'EGFR ont été détectées chez 10 patients (9,1%) avec un diagnostic histologique de cancer pulmonaire non à petites cellules dont 2 sur tissu uniquement, en accord avec les données de la littérature. La mutation de résistance T790M a été détectée chez seulement 10 patients (31,2%) sous TKI, dont 1 sur tissu uniquement et 1 sur BL uniquement. La concordance entre le statut de mutation de l'EGFR dans le plasma et le tissu tumoral était de 95,91% (κ de Cohen = 0,77,) au diagnostic et de 77% (κ de Cohen = 0,5) lors de la progression sous TKI.

Conclusions : La recherche par dPCR et NGS de mutations actionnables d'EGFR dans le plasma de patients atteints de cancer du poumon métastatique permet un génotypage exhaustif au diagnostic notamment quand la quantité de tissu est insuffisante ou la biopsie impossible. A progression sous TKI, l'identification de mécanismes de résistance par BL permet une adaptation plus rapide du traitement à condition qu'elle soit répétée plusieurs fois.

Mots-clés : Biopsie liquide, ADN libre circulant, cancer pulmonaire, mutation EGFR.