



HAL
open science

Les ADN tumoraux circulants et leur rôle dans les cancers colorectaux métastatiques : application en théranostique

Marianna Muller

► **To cite this version:**

Marianna Muller. Les ADN tumoraux circulants et leur rôle dans les cancers colorectaux métastatiques : application en théranostique. Sciences pharmaceutiques. 2017. hal-01932258

HAL Id: hal-01932258

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01932258>

Submitted on 23 Nov 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

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

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE DE LORRAINE
2017**

FACULTE DE PHARMACIE

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 21 septembre 2017, sur un sujet dédié à :

**Les ADN tumoraux circulants
et leur rôle dans les cancers colorectaux métastatiques :
application en théranostique**

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Marianna MULLER (SARIBEKYAN)

née le 20 juin 1984 à Leninakan (ARMENIE)

Membres du Jury

Président : Pr Jean-Louis Merlin : PU-PH Université de Lorraine – Institut de Cancérologie de Lorraine, Pharmacien Biologiste
Juges : Dr Alexandre Harlé : MCU-PH Université de Lorraine – Institut de Cancérologie de Lorraine, Pharmacien Biologiste
Dr Céline Gavaille : Praticien spécialiste des Centres de Lutte contre le Cancer, Oncologue Médical
Dr Alain Bruno : Recherche Translationnelle & Clinique Oncologie – Institut de Recherches Internationales Servier, Pharmacologue

**UNIVERSITE DE LORRAINE
2017**

FACULTE DE PHARMACIE

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 21 septembre 2017, sur un sujet dédié à :

**Les ADN tumoraux circulants
et leur rôle dans les cancers colorectaux métastatiques :
application en théranostique**

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Marianna MULLER (SARIBEKYAN)

née le 20 juin 1984 à Leninakan (ARMENIE)

Membres du Jury

Président : Pr Jean-Louis Merlin : PU-PH Université de Lorraine – Institut de Cancérologie de Lorraine, Pharmacien Biologiste
Juges : Dr Alexandre Harlé : MCU-PH Université de Lorraine – Institut de Cancérologie de Lorraine, Pharmacien Biologiste
Dr Céline Gavaille : Praticien spécialiste des Centres de Lutte contre le Cancer, Oncologue Médical
Dr Alain Bruno : Recherche Translationnelle & Clinique Oncologie – Institut de Recherches Internationales Servier, Pharmacologue

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2016-2017

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Béatrice FAIVRE

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Conseil de la Pédagogie

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Président, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Président, Raphaël DUVAL

Responsable de la filière Officine

Béatrice FAIVRE

Responsables de la filière Industrie

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable de la filière Hôpital

Béatrice DEMORE

Responsable Pharma Plus ENSIC

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable Pharma Plus ENSAIA

Raphaël DUVAL

Responsable Pharma Plus ENSGSI

Igor CLAROT

Responsable de la Communication

Marie-Paule SAUDER

**Responsable de la Cellule de Formation Continue
et individuelle**

Béatrice FAIVRE

**Responsable de la Commission d'agrément
des maîtres de stage**

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Jean-Claude BLOCK

Max HENRY

Alain MARSURA

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Vincent LOPPINET

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN
 Marie-Hélène LIVERTOUX
 Bernard MIGNOT
 Jean-Louis MONAL
 Blandine MOREAU
 Dominique NOTTER
 Christine PERDICAKIS
 Marie-France POCHON
 Anne ROVEL
 Gabriel TROCKLE
 Maria WELLMAN-ROUSSEAU
 Colette ZINUTTI

ENSEIGNANTS	<i>Section CNU</i>	<i>Discipline d'enseignement</i>
PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS		
Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Alain NICOLAS	80	<i>Chimie analytique et Bromatologie</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique et Epidémiologie</i>
PROFESSEURS DES UNIVERSITES		
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Igor CLAROT	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique, Audioprothèse</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Biologie cellulaire, Hématologie</i>
Luc FERRARI	86	<i>Toxicologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Frédéric JORAND	87	<i>Eau, Santé, Environnement</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>
MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS		
Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Alexandre HARLE	82	<i>Biologie cellulaire oncologique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>
MAITRES DE CONFÉRENCES		
Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Xavier BELLANGER	87	<i>Parasitologie, Mycologie médicale</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>

Cédric BOURA	86	Physiologie
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie galénique
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER	86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86/01	Droit en Santé
Christophe MERLIN	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Marianne PARENT	85	Pharmacie galénique
Francine PAULUS	85	Informatique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Guillaume SAUTREY	85	Chimie analytique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Sabrina TOUCHET	86	Pharmacochimie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

*Disciplines du Conseil National des Universités :

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER
AUCUNE APPROBATION, NI
IMPROBATION AUX OPINIONS
EMISES DANS LES THESES, CES
OPINIONS DOIVENT ETRE
CONSIDEREES COMME PROPRES
A LEUR AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement, en tout premier lieu, mon directeur de thèse le Pr Jean-Louis MERLIN pour m'avoir initiée au monde de la cancérologie. Travailler avec lui fut une expérience très enrichissante aussi bien scientifiquement qu'humainement. Il m'a permis de m'épanouir en me laissant la liberté d'agir, tout en gardant un œil bienveillant sur ma progression professionnelle.

Je remercie tout particulièrement Alexandre HARLE pour ses conseils et son appui dans la rédaction de cette thèse. Je le remercie également pour avoir accepté de juger mes travaux.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail, Céline GAVOILLE et Alain BRUNO pour avoir accepté de juger ce travail.

Je ne saurais conclure ces remerciements sans exprimer ma gratitude pour le soutien constant de mes parents et mes beaux-parents, qui ont su croire en moi et qui m'ont apporté toute leur aide quand j'en ai eu besoin.

J'adresse un remerciement incontournable à celui qui est mon premier lecteur et mon premier supporter : mon mari. Merci pour ton soutien, ta compréhension, ta patience et pour être toujours là quand j'ai besoin de toi. Je te remercie pour tes précieux conseils, pour tous mes moments de doute et d'incertitude où tu as toujours su me reconforter. Merci de rendre ma vie plus belle.

Et enfin je remercie mon petit Hayk pour sa capacité à me donner envie d'avancer et pour sa maturité, qui a pu supporter mon éloignement et qui a pu continuer à être sage malgré mon absence.

Tables de matières

Remerciements	
Liste de figures	
Liste de tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction générale	8
Chapitre I : Introduction bibliographique et objectif de travail	11
I. Introduction bibliographique et objectif de travail	12
I.1. Cancer colorectal métastatique	12
I.1.1. Epidémiologie.....	12
I.1.1.1. En France	12
I.1.1.2. Dans le monde.....	15
I.1.2. Survie et Pronostic.....	17
I.1.3. Classification	18
I.1.4. Facteurs de risque	20
I.1.5. Signes cliniques	22
I.1.6. Dépistage et diagnostic.....	23
I.1.7. Traitement du CCR métastatique et son évolution	24
I.1.7.1. Les chimiothérapies avec les cytotoxiques traditionnels.....	25
I.1.7.2. Anticorps monoclonaux, protéines de fusion recombinantes et inhibiteurs de kinases utilisés dans le traitement des CCR métastatiques.....	27
I.1.7.3. Le Panitumumab.....	27
I.1.7.4. Le Cetuximab.....	29
I.1.7.5. Le Bevacizumab	31
I.1.7.6. L'Aflibercept	32
I.1.7.7. Regorafenib	32
I.1.7.8. Influence de l'évolution des traitements sur la survie globale chez les patients atteints d'un CCR métastatique	33
I.1.7.9. La prise en charge standard actuelle du cancer colorectal métastatique	34
I.2. Oncogenèse colorectale.....	37
I.2.1. Les mécanismes de cancérogénèse dans le CCR.....	37
I.2.1.1. Le phénotype CIN	37
I.2.1.2. Le phénotype MSI.....	38
I.2.1.3. Le phénotype CIMP	40
I.2.2. Signalisation cellulaire dans les CCR	40
I.2.2.1. Les voies de signalisations de l'EGFR	40
I.2.2.2. Voie des MAPKinases	42
I.2.2.3. Voie PI3K/AKT/mTOR	44
I.3. Les mutations des gènes KRAS, NRAS et BRAF	46
I.3.1. Mutations des gènes <i>KRAS</i> et <i>NRAS</i>	47
I.3.2. Mutations du gène BRAF	48
I.4. ADN circulants	50
I.4.1. Histoire et caractéristiques générales des acides nucléiques circulants.....	50

I.4.2. Source des ADN circulants	53
I.4.3. Quantification des ADN circulants	55
Chapitre II : Intérêt	56
II. Intérêt.....	57
II.1. ADN circulants chez les sujets sains et dans les pathologies autres que cancer.....	57
II.2. ADN circulant et cancer	58
II.3. ADN circulant et CCR métastatique	63
Chapitre III : Techniques de détection	66
III. Techniques de détection	67
III.1. PCR	69
III.2. Le séquençage de nouvelle génération (NGS)	74
III.3. BEAMing	76
Chapitre IV : Conclusion	81
IV. Conclusion	82
Bibliographie.....	87
Annexes.....	99

LISTE DE FIGURES

Figure 1 : Anatomie du système digestif	9
Figure 2 : Classement des cancers par incidence estimée en 2012 en France métropolitaine par localisations selon le sexe	13
Figure 3 : Classement des différents cancers par mortalité estimée en 2012 en France métropolitaine par localisations selon le sexe.....	14
Figure 4 : Place des CCR parmi les cancers les plus fréquents aux Etats-Unis en 2015, chez les hommes et femmes.	16
Figure 5 : 7ème classification TNM pour les CCR.....	18
Figure 6 : Classification en stade de CCR	19
Figure 7 : Répartition en pourcentages des formes de CCR	20
Figure 8 : Relation entre l'OS et le pourcentage de patients recevant du 5-FU, de l'Irinotécan et de l'Oxaliplatine	25
Figure 9 : Comparaison entre les protocoles FOLFOX <i>versus</i> FOLFIRI dans la première ligne de traitement de CCR.....	26
Figure 10 : Comparaison de survie globale entre les 2 traitements : Panitumumab/FOLFOX4 <i>versus</i> FOLFOX4, chez les patients avec des CCR métastatiques portant ou pas les mutations sur l'exon 2 du gène <i>KRAS</i>	28
Figure 11 : Comparaison de temps de survie entre les traitements Panitumumab/FOLFOX4 <i>versus</i> FOLFOX4, chez les patients avec des CCR métastatiques portant ou pas les mutations sur l'exon 2 du gène <i>KRAS</i>	28
Figure 12 : Rôle du RAS dans le mécanisme d'action du Panitumumab.....	29
Figure 13 : Comparaison de survie sans progression et de survie globale, chez les patients avec un CCR avec ou sans présence des mutations, avec le traitement FOLFIRI et Cetuximab/FOLFIRI.....	30
Figure 14 : Evolution de la survie globale de 1976 à nos jours.....	33
Figure 15 : Les étapes de cancérogénèse du cancer colorectal.....	38
Figure 16 : Représentation des sous-types des CCR. Les MSI sont liés avec l'hyperméthylation, l'hyperméthylation, l'infiltration immunitaire, l'activation des mutations de RAS et <i>BRAF</i> et ils sont localisés dans les parties proximales de côlon.	39
Figure 17 : Les récepteurs de la famille HER.....	41
Figure 18 : Schéma de la voie RAS/MAPK	42
Figure 19 : Cascade de signalisation de MAPK. MAPK agit sur un grand nombre de processus qui sont impliqués dans la cancérogénèse	43
Figure 20 : Forme active et inactive de la protéine RAS	44
Figure 21 : Schéma de voie PI3K/AKT/mTOR	45
Figure 22 : Fréquence des mutations <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> et <i>BRAF</i> chez les patients avec CCR	46
Figure 23 : La localisation des mutations <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> et <i>BRAF</i>	49

Figure 24 : Les différentes sources d'ADN tumoral circulant dans le sang chez les patients avec un cancer et leur importance biologique	53
Figure 25 : Les différentes sources d'ADN tumoral circulant dans le sang	55
Figure 26 : Facteurs influençant les changements quantitatifs et qualitatifs observés sur les ADN circulants dans le sang de patients cancéreux.....	59
Figure 27 : Application de « biopsie liquide ».....	61
Figure 28 : Détection des différents types d'ADN tumoral circulant chez les patients avec différents types de cancer.	62
Figure 29 : Méthodes utilisées en recherche clinique pour la détection d'altérations génétiques dans les tissus tumoraux.....	68
Figure 30 : Comparaison des procédures de la PCR classique et de la PCR digitale	71
Figure 31 : Analyse par DPCR en microgouttelettes.....	72
Figure 32 : Principales étapes de génération et d'analyse de données NGS.....	75
Figure 33 : Les principales étapes de la méthode BEAMing	79

LISTE DE TABLEAUX

Tableau 1 : Prise en charge standard de CCR métastatique.....	36
Tableau 2 : Détection de mutation KRAS chez les patients avec CCR métastatique.....	47
Tableau 3 : Comparaison de détection de mutation des gènes KRAS dans le cancer et dans le plasma.....	64
Tableau 4 : Concordance entre les analyses de tissus tumoraux et les ADNct (n=95), l'analyse est faite par test Inplex.	64

LISTE DES ABREVIATIONS

ACE	Antigène carcino-embryonnaire
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNcf	ADN circulant libre
ADNct	ADN tumoral circulant
ARN	Acide RiboNucléique
BEAMing	<i>Beads, Emulsion, Amplification, Magnetics</i>
CA 15-3	Antigène tumoral 15-3
CCR	Cancer Colorectal
CIMP	<i>CpG Island Methylator</i>
CIN	<i>Chromosomal Instability</i>
CTC	Cellules tumorales circulantes
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
GDP	Guanosine DiPhosphate
GTP	Guanosine TriPhosphate
HER	<i>Human Epidermal Receptor</i>
mAb	Anticorps monoclonaux
MICI	Maladie Inflammatoire Chronique de l'intestin
MSI	<i>Microsatellite Instability</i>
MMR	<i>Mismatch Repair</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MEK	MAPK-ERK-Kinase
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NSCLC	<i>Non-Small Cell Lung Cancer</i>
OS	Survie Globale
PFS	Survie sans progression
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
RR	Taux de réponse
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TNM	<i>Tumor, Nodes, Metastasis</i>
VEGF	Facteurs Vasculaires Endothéliaux
PSA	Antigène spécifique de la prostate

5-FU

5-FdUMP

5-FUTP

5-Fluorouracile

5-fluorodésoxy-uracile monophosphate

5-fluorouridine triphosphate

Introduction générale

Comme son nom l'indique, le cancer colorectal (CCR) se forme dans le côlon ou dans le rectum, dans la dernière partie du gros intestin.

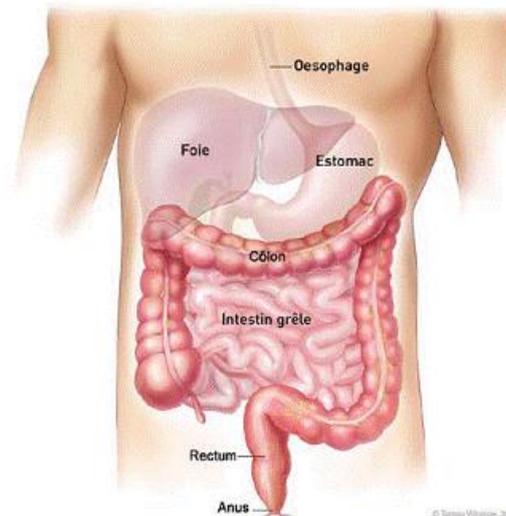


Figure 1 : Anatomie du système digestif. Le côlon et le rectum assurent des fonctions essentielles dans les dernières étapes de la digestion. La digestion commence dans la bouche, où la nourriture mastiquée se défait en petits morceaux, puis est avalée. Ensuite par l'œsophage jusque dans l'estomac, où elle est désagrégée par les sucs gastriques, puis rejetée dans l'intestin grêle. Celui-ci la décompose encore davantage et en absorbe les substances nutritives (glucides, protéines et vitamines, notamment), la matière qui en reste parvenant alors au côlon qui a surtout pour fonction d'absorber l'eau des déchets de nourriture et d'en faire une matière semi solide, les « selles » [Association canadienne du cancer colorectal 2017].

Le CCR reste un problème significatif pour la santé publique. Malgré des avancées dans le domaine de la thérapie ciblée, la survie à 5 ans continue à stagner aux alentours de 10%.

A la fin des années 1940 et au début des années 1950, le CCR a été le cancer le plus fréquent par sa mortalité en Amérique. Aujourd'hui ce cancer est le troisième par sa mortalité chez les femmes comme chez les hommes ; ceci est le résultat des changements des facteurs de risques (par exemple la diminution de l'utilisation du tabac et de la consommation de la viande rouge et l'augmentation de l'utilisation de l'aspirine), mais également grâce à l'introduction des nouveaux tests permettant la détection précoce (méthodes de dépistage) et l'amélioration de la prise en charge de cette maladie [Siegel *et al*, 2015], [Jemal *et al*, 2011].

Dans les pays occidentaux, le CCR est le troisième type de cancer par sa fréquence.

Dans le monde, par son incidence, ce cancer est le troisième chez les femmes et le quatrième chez les hommes.

Pendant la dernière décennie, il y a eu un énorme progrès dans le domaine des traitements et de la prise en charge du CCR métastatique, ce qui a permis de rallonger la survie sans progression (PFS) et la survie totale (OS) de cette maladie. Cette amélioration est due à l'introduction des combinaisons des standards chimiothérapies (5-FU/ acide folique, Irinotécan et Oxaliplatine) avec de nouveaux médicaments comme les anticorps monoclonaux (mAb) contre les récepteurs de facteurs de croissance de l'épiderme (EGFR) ou les anticorps monoclonaux contre les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF).

En revanche, chez certains patients, cette thérapie ciblée ne fonctionne pas ; des études ont montré que ces patients présentent des mutations sur les gènes *KRAS*, *NRAS* et *BRAF*.

De nos jours, pour l'organisation de la prise en charge du CCR métastatique, la détection des mutations des gènes *KRAS*, *NRAS* et *BRAF* est fortement recommandée. La présence de ces mutations est une contre-indication pour la prescription de la thérapie ciblée avec les anti EGFR [Wang *et al*, 2007], [Huang *et al*, 2014].

Le CCR peut passer inaperçu sans des signes cliniques remarquables et, pour cette raison, ce cancer est généralement diagnostiqué très tardivement dans des stades avancés et en présence de plusieurs métastases, notamment des métastases hépatiques. L'efficacité de traitement dépend fortement du stade de cancer, c'est pourquoi il est très important de diagnostiquer ce cancer dans les stades précoces et avant l'apparition de métastases.

Pour résoudre ces problèmes, de nombreux chercheurs travaillent pour trouver de nouveaux marqueurs de CCR qui permettront de diagnostiquer les CCR en stades précoces. La recherche des ADN circulants libres (ADNcf) dans le sang ou les urines semble une bonne solution pour résoudre ce problème.

Chapitre I

Introduction bibliographique et objectif de travail

I. Introduction bibliographique et objectif de travail

I.1. Cancer colorectal métastatique

I.1.1. Epidémiologie

I.1.1.1. En France

Incidence : Avec 42 152 nouveaux cas estimés en 2012 dont 55% survenant chez l'homme, le cancer du côlon-rectum se situe, tous sexes confondus, au troisième rang des cancers les plus fréquents, après le cancer de la prostate (56 841 nouveaux cas) et le cancer du sein (48 763). Il représente près de 12% de l'ensemble des cancers incidents tous sexes confondus [World Health Organization, 2012].

Chez l'homme, le cancer du côlon-rectum se situe au troisième rang des cancers incidents masculins, (23 226 nouveaux cas estimés en 2012), loin derrière le cancer de la prostate et juste derrière le cancer du poumon. Il représente 11,6% de l'ensemble des cancers incidents masculins (Figure 2).

Chez la femme, il se situe au deuxième rang (18 926 cas), derrière le cancer du sein et avant le cancer du poumon. Il représente 12,2% de l'ensemble des cancers incidents féminins (Figure 2).

Chez les hommes comme chez les femmes, une très large majorité des nouveaux cas de cancer du côlon-rectum estimés en 2012 surviennent chez les personnes âgées de 50 ans et plus.

Avant 50 ans, les taux d'incidence sont faibles et proches entre les deux sexes, puis les taux augmentent avec l'âge, plus rapidement chez l'homme que chez la femme. L'âge médian au diagnostic a été estimé à 71 ans chez l'homme et 75 ans chez la femme [Institut National Du Cancer, 2014].

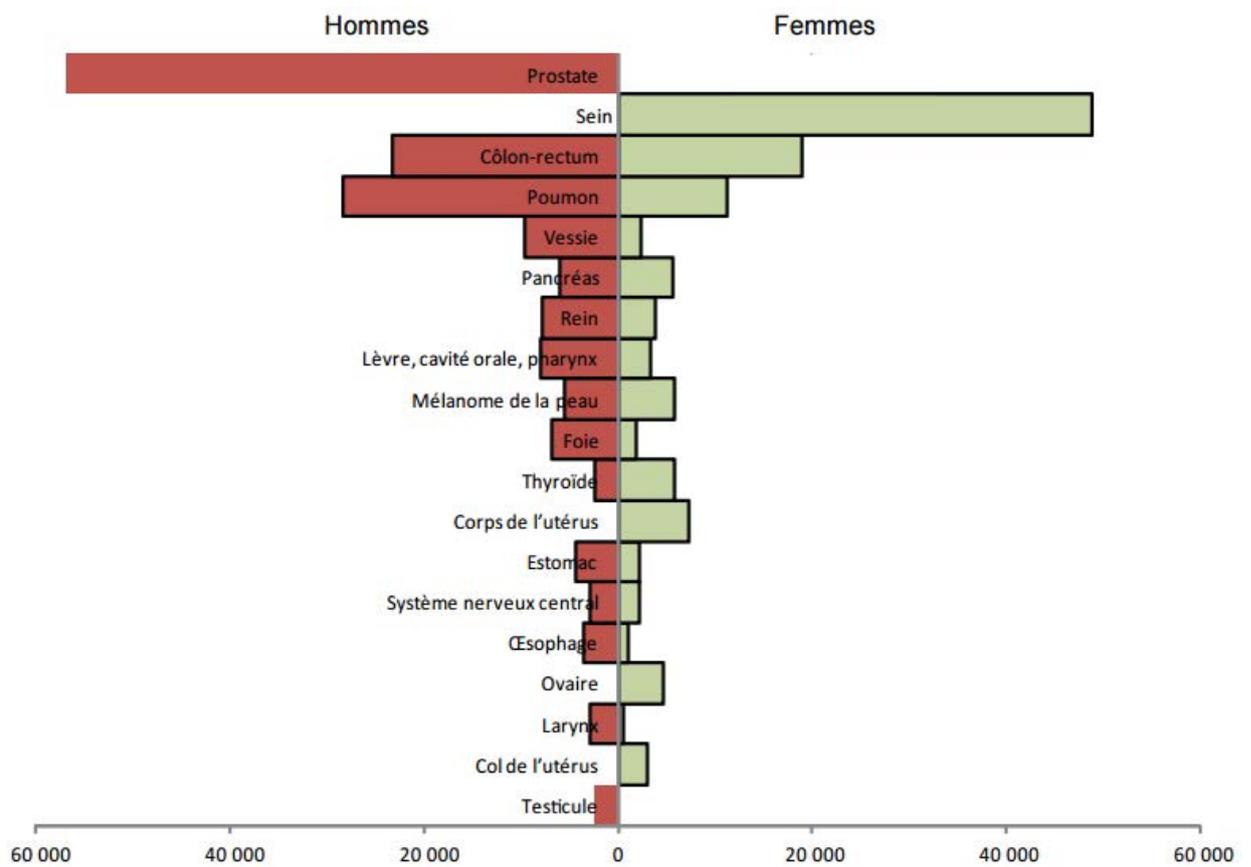


Figure 2 : Classement des cancers par incidence estimée en 2012 en France métropolitaine par localisations selon le sexe. Par sa fréquence, le CCR est en deuxième place chez les femmes après le cancer du sein et en troisième chez les hommes après les cancers de la prostate et du poumon [Institut National Du Cancer].

Mortalité : Avec environ 17 722 décès estimés en 2012 (dont 52% chez l'homme), le cancer du côlon-rectum se situe, tous sexes confondus, au deuxième rang des décès par cancer derrière le cancer du poumon (29 949 décès) et devant le cancer du sein (11 886 décès). Il représente près de 12% de l'ensemble des décès par cancer.

Chez l'homme, la mortalité par cancer colorectal se situe au deuxième rang des décès par cancers masculins, avec 9 275 décès estimés en 2012, loin derrière le cancer du poumon (21 326) et juste avant le cancer de la prostate (8 876). Il représente près de 11% des décès par cancers masculins.

Chez la femme, il se situe au troisième rang (8 447 décès), derrière le cancer du sein (11 886) et le cancer du poumon (8 623). Il représente environ 13,5% des décès par cancers féminins.

La répartition de la mortalité en fonction de l'âge est similaire à celle de l'incidence. Environ 80% des décès par cancer colorectal surviennent chez les hommes de 65 ans et plus, cette proportion est de 85% chez les femmes [Institut National Du Cancer] (Figure 3).

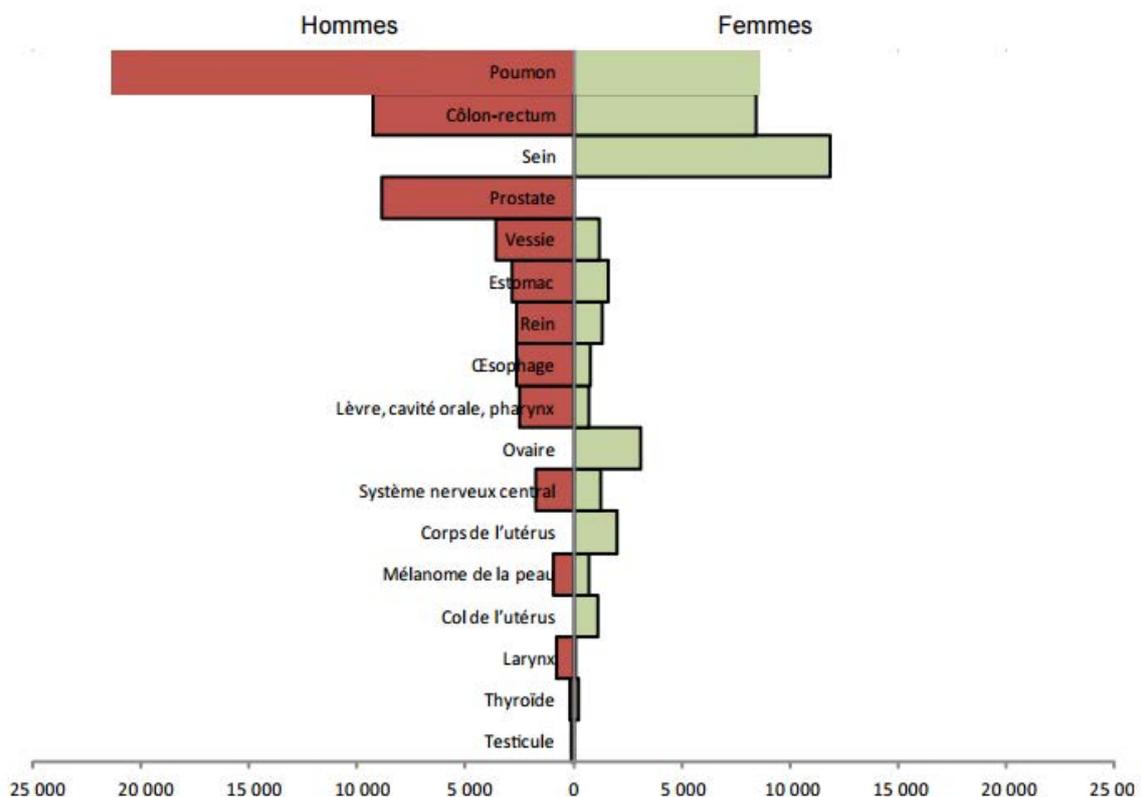


Figure 3 : Classement des différents cancers par mortalité estimée en 2012 en France métropolitaine par localisations selon le sexe. Chez les hommes le cancer du poumon est en première place par sa mortalité alors que chez les femmes la première place est occupée par le cancer du sein [Institut National Du Cancer].

I.1.1.2. Dans le monde

Le CCR est le troisième cancer le plus fréquent survenant chez les hommes et le deuxième chez les femmes ; il constitue 9,2% de l'ensemble des cas de cancer au monde chez les hommes et les femmes. Environ 8,5% de la mortalité totale associée au cancer dans le monde entier est attribuée au CCR [Wilmink *et al*, 1997].

En Australie, en Nouvelle Zélande, au Canada, aux Etats-Unis et en Europe, l'incidence du CCR est haute ; en revanche en Chine, en Inde et en Afrique, l'incidence est plus basse. Une forte augmentation est remarquée en Europe et au Japon [Boyle *et al*, 2000].

En Inde, en 2012, le nombre des nouveaux cas chez les hommes a été de 36 917 et chez les femmes de 27 415 ; la mortalité a été de 27 814 cas chez les hommes et de 20 789 chez les femmes [World Health Organization, 2012].

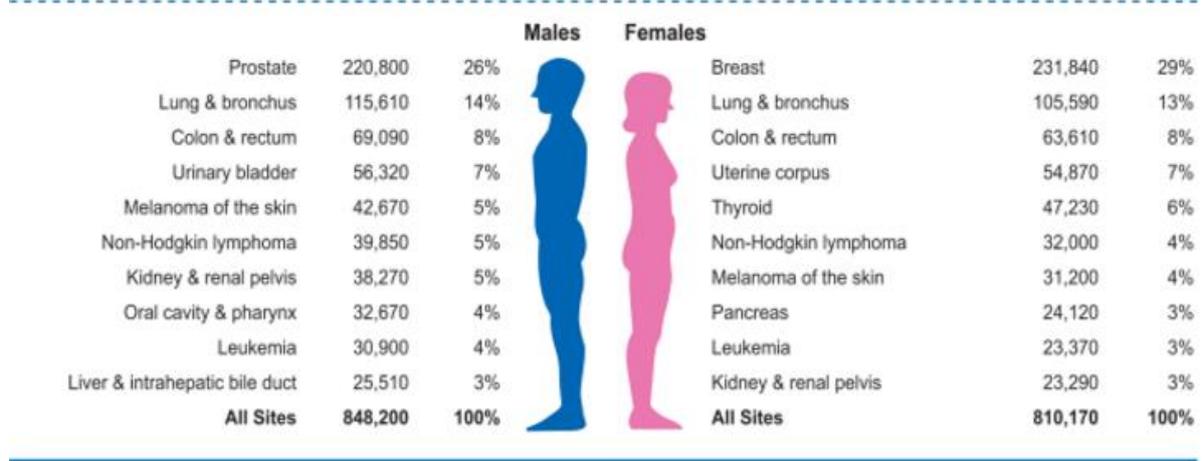
Entre les deux sexes, l'incidence du CCR est presque la même avec une légère prédominance chez les hommes.

Dans le monde, la mortalité liée aux CCR est de 394 000 par an.

Aux Etats-Unis, la mortalité de ce cancer occupe la deuxième place chez les femmes et les hommes (Figure 4) [Centers for Disease Control and Prevention, 1999-2005].

Aux Etats-Unis et en Europe, depuis les 30 dernières années, on observe une augmentation significative des cas de CCR, qui peut être expliquée d'une part par une augmentation des facteurs de risque et d'autre part par une amélioration des méthodes de dépistage (Figure 4).

Estimated New Cases



Estimated Deaths

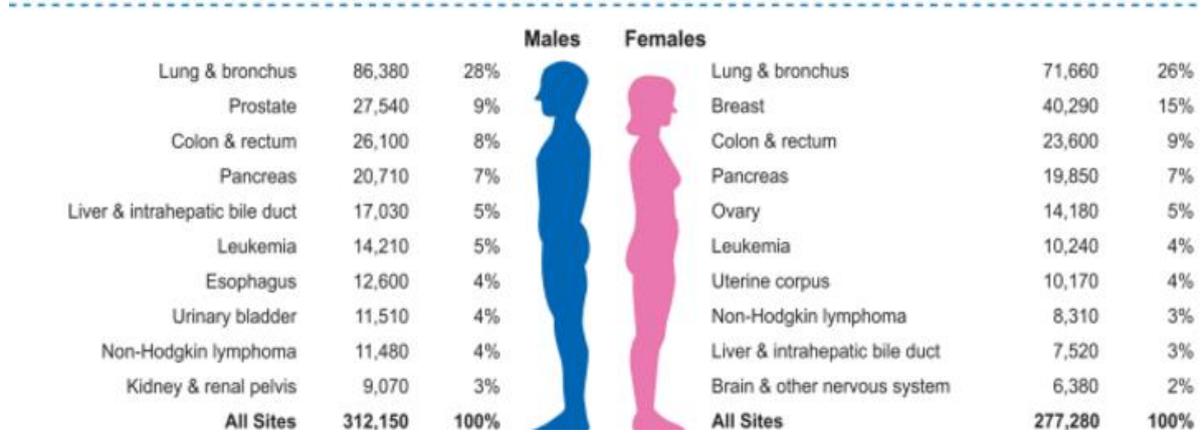


Figure 4 : Place des CCR parmi les cancers les plus fréquents aux États-Unis en 2015, chez les hommes et femmes. Le CCR est le quatrième cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les hommes et femmes, après les cancers du sein, de la prostate et des poumons aux États-Unis [Siegel *et al*, 2015].

I.1.2. Survie et Pronostic

La survie face au CCR dépend fortement du stade de découverte de la maladie : plus le cancer est découvert dans les stades précoces, plus la survie est longue.

Survie nette (c'est-à-dire celle qu'on observerait si la seule cause de décès des personnes atteintes de cancer était le CCR) en 2008 (diagnostics portés entre 1989 et 2004) :

- **Globale** : 79 % à 1 an, 56 % à 5 ans, 50 % à 10 ans.
- **Chez les hommes** : 80 % à 1 an, 56 % à 5 ans, 48 % à 10 ans.
- **Chez les femmes** : 79 % à 1 an, 57 % à 5 ans, 52 % à 10 ans [World Health Organization, 2012].

Depuis 1960, la survie face à ce cancer a augmenté. Dans les pays plus développés, la survie est plus élevée ; cet événement peut être expliqué par la différence de développement des méthodes de dépistage, diagnostic et de traitement.

Le CCR n'a pas de signes cliniques accentués et, pour cette raison, ces cancers ne sont pas souvent trouvés dans les stades précoces mais déjà en stade métastatique. Dans certains cas ce sont les métastases qui révèlent les CCR primitifs.

Les métastases sont observées dans 40 à 60% des cas de CCR ; dans 25% des cas, ces métastases sont synchrones c'est-à-dire qu'elles sont déjà présentes au moment du diagnostic. Environ 30 à 50% des patients atteints de CCR développent des métastases hépatiques, qui sont responsables de deux tiers des décès par ce cancer [Abdalla *et al*, 2006].

Les localisations extrahépatiques sont plus rares et sont des facteurs de mauvais pronostic.

I.1.3. Classification

La classification de CCR est réalisée par deux méthodes :

1. La classification la plus connue du CCR est la classification TNM (*Tumor, Nodes, Metastasis*).

Pour déterminer le stade de cancer, il faut mesurer son étendue et pour cela il faut déterminer 3 critères principaux :

- Taille et profondeur de la tumeur (T)
- Atteinte ou non des ganglions lymphatiques et nombre de ganglions atteints (N)
- Présence ou non de métastases (M) (Figure 5).

T	Tumeur primitive
Tx	Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive
T0	Pas de signes de tumeur primitive
Tis	Carcinome <i>in situ</i> : intra-épithélial ou envahissant la lamina propria
T1	Tumeur envahissant la sous-muqueuse
T2	Tumeur envahissant la musculuse
T3	Tumeur envahissant la sous-séreuse ou les tissus péricoliques et péri-rectaux non péritonéalisés
T4	T4a : Tumeur perforant le péritoine viscéral T4b : Tumeur envahissant directement les autres organes ou structures
N	Adénopathies régionales
Nx	Renseignements insuffisants pour classer les adénopathies régionales
N0	Pas de métastase ganglionnaire régionale
N1a	Métastase dans 1 ganglion lymphatique régional
N1b	Métastase dans 2 à 3 ganglions lymphatiques régionaux
N1c	Nodule(s) tumoraux, c-à-d satellite(s) dans la sous-séreuse, ou dans les tissus non péritonéalisés péricoliques ou périrectaux sans métastase ganglionnaire régionale
N2a	Métastase dans 4-6 ganglions lymphatiques régionaux
N2b	Métastase dans 7 ou plus ganglions lymphatiques régionaux
M	Métastases à distance
M0	Pas de métastases à distance
M1a	Métastase localisée à un seul organe (foie, poumon, ovaire, ganglion(s) lymphatique(s), autre que régional
M1b	Métastases dans plusieurs organes ou péritonéales

Figure 5 : 7ème classification TNM pour les CCR. Pour évaluer l'étendue d'un cancer colorectal, trois critères sont pris en compte : la taille et la profondeur de la tumeur (T), l'atteinte ou non des ganglions lymphatiques et le nombre de ganglions atteints (N) et la présence ou non de métastases (M) [Sobine et al, 2010].

2. A partir de la classification TNM, les CCR sont ensuite classés en stades.

Stade 0	Tis	N0	M0
Stade I	T1, T2	N0	M0
Stade II	T3, T4	N0	M0
Stade IIA	T3	N0	M0
Stade IIB	T4a	N0	M0
Stade IIC	T4b	N0	M0
Stade III	tous T	N1, N2	M0
Stade IIIA	T1, T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
Stade IIIB	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T1, T2	N2b	M0
Stade IIIC	T4a	N2a	M0
	T3, T4a	N2b	M0
	T4b	N1, N2	M0
Stade IVA	tous T	tous N	M1a
Stade IVB	tous T	tous N	M1b

Figure 6 : Classification en stade de CCR. Le stade des cancers colorectaux au moment du diagnostic est généralement exprimé par un chiffre romain allant de 0 à IV. Plus le stade est élevé, plus la maladie est avancée et moins le diagnostic clinique est favorable [Sobine *et al*, 2010].

Plus le stade est avancé, plus le pronostic de la maladie est grave et la survie est courte (Annexe 1).

I.1.4. Facteurs de risque

Plusieurs facteurs de risque sont associés avec le CCR. Les facteurs de risque que l'individu ne peut pas contrôler sont l'âge et les facteurs héréditaires. Il existe également un grand nombre de facteurs de risque liés à l'environnement et au mode de vie qui peuvent être contrôlés (Figure 7).

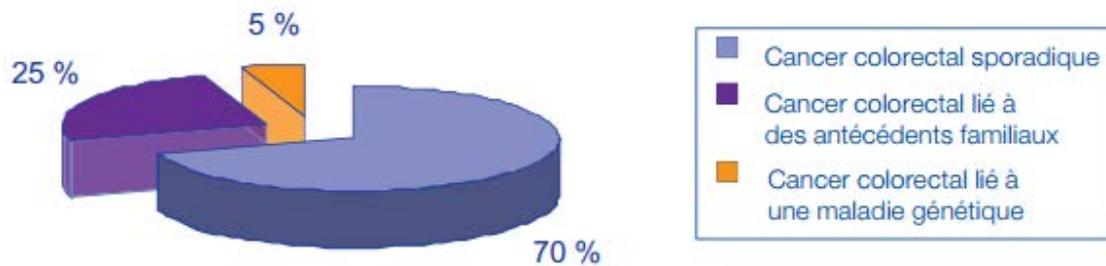


Figure 7 : Répartition en % des formes de CCR. 70% sont des CCR sporadiques, 25% sont liés à des antécédents familiaux et 5% sont liés à une maladie génétique [Jackson-Thompson *et al*, 2006].

Facteurs de risque non contrôlables

Les facteurs héréditaires ont un grand rôle : 5 à 10% des CCR ont une cause héréditaire. 20% des personnes ayant ce cancer ont un membre de leur famille qui a été touché par cette maladie [Jackson-Thompson *et al*, 2006] (Figure 7).

Maladie inflammatoire du côlon: Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent deux maladies : la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Ces maladies touchent environ une personne sur mille (incidence de 5 cas/100 000 habitants/an) à un âge compris entre 20 et 30 ans (Figure 7).

Age : La probabilité de CCR augmente progressivement après 40 ans, et elle augmente fortement après 50 ans [Jong *et al*, 2005].

Facteurs de risque contrôlables

Facteurs diététiques : Le risque de cancer colorectal est fortement lié avec les habitudes nutritionnelles. Une nourriture riche en graisse, surtout animale et l'utilisation très fréquente de viande rouge augmente la probabilité de cancer. En revanche, la consommation de fruits et légumes diminue la probabilité de CCR [Willett *et al*, 2005].

Activité physique et obésité : Ces 2 facteurs de risque sont fortement liés à l'apparition de CCR. L'activité physique améliore le métabolisme, la motilité des intestins et l'apport d'oxygène aux cellules [Zisman *et al*, 2006].

Tabagisme : L'influence du tabac sur le cancer du poumon a été très bien montrée mais le tabagisme a également une grande influence sur le CCR : dans presque 12% des cas de CCR, les malades sont des fumeurs [Zisman *et al*, 2006].

Consommation d'alcool : La consommation d'alcool augmente le risque d'apparition d'un CCR. Le métabolite de l'alcool, l'acétaldéhyde, a des propriétés carcinogènes. Il a été montré également que l'alcool peut faciliter l'entrée dans la cellule d'autres cancérigènes [Pöschl G *et al*, 2004].

I.1.5. Signes cliniques

Les CCR peuvent rester très longtemps cachés, car ils ne provoquent pas de symptômes particuliers ; les symptômes apparaissent souvent une fois que la tumeur attaque des tissus et organes voisins.

Des troubles du transit intestinal :

- Constipation soudaine ou qui s'aggrave
- Diarrhée qui se prolonge
- Augmentation du volume abdominal
- Selles plus étroites que d'habitude
- Besoin pressant et continu d'aller à la selle (en particulier le matin)
- Tension au niveau du rectum ou sensation qu'il est plein
- Sensation d'évacuation incomplète ou de fausse envie d'aller à la selle, même juste après y être allé
- Efforts d'expulsion des selles douloureux et inefficaces
- Vomissements

Des saignements

- Les selles peuvent être recouvertes ou mêlées de sang rouge clair, très foncé ou noir (si le sang est digéré dans le côlon).

Des symptômes plus rares

- Des glaires émises par l'anus
- Anémie (baisse du nombre de globules rouges)
- Occlusion intestinale
- Péritonite
- Coloration jaunâtre de la peau et des muqueuses (s'il y a une occlusion)
- Altération de l'état de santé général (perte d'appétit, amaigrissement, fatigue)

I.1.6. Dépistage et diagnostic

Il est très important de diagnostiquer le CCR dans les stades précoces pour pouvoir assurer la meilleure prise en charge. Il existe plusieurs options afin de procéder à un dépistage précoce du CCR.

Son dépistage fait appel à deux procédures distinctes.

Un programme de dépistage organisé communautaire : proposé dans le cadre d'une campagne nationale. Ce test est réalisé tous les 2 ans chez des sujets âgés de 50 à 74 ans asymptomatiques. L'Union Européenne recommande le dépistage par le test Hemoccult II. L'incidence du CCR est réduite grâce à ce test, dont le but est de mettre en évidence la présence d'un saignement occulte dans les selles.

Un dépistage individuel opportuniste : si le médecin consultant a identifié des antécédents personnels ou familiaux de sur-risque de CCR ou des signes fonctionnels nécessitant la mise en œuvre de la procédure de dépistage individuel par coloscopie.

La coloscopie permet de visualiser la totalité du côlon et du rectum, pour chercher la présence d'anomalies pré-néoplasiques et de réaliser dans le même temps une exérèse et une biopsie des tumeurs et/ou des polypes. A partir de cet examen, une stratégie thérapeutique et un suivi adapté seront mis en place.

Sur la période 2012-2013, 18 millions de personnes âgées de 50 à 74 ans ont été invitées à se faire dépister. Cinq millions d'entre elles ont réalisé le test, soit un taux de participation de 31%. Elle reste toutefois inférieure aux recommandations européennes de 45% au minimum. Cette participation est plus élevée chez les femmes (32,8%) que chez les hommes (29,1%), quelle que soit la tranche d'âge observée [Institut National Du Cancer].

Le Plan cancer 2014-2019 prévoit l'optimisation du dépistage organisé du cancer colorectal par le déploiement du test immunologique. Ce test repose sur la détection de la présence d'hémoglobine humaine dans les selles grâce à l'utilisation d'anticorps. Son déploiement a été décidé à la suite de l'avis favorable de la Haute Autorité de santé (HAS, 2008) et au rapport de l'INCa (INCa, 2011).

Les tests immunologiques permettent de détecter des saignements plus faibles. Enfin, du fait de sa performance accrue et d'une forme plus simple d'utilisation, l'introduction du test immunologique a un impact sur son acceptabilité par la population et donc sur la participation au programme.

I.1.7. Traitement du CCR métastatique et son évolution

Les stratégies thérapeutiques du CCR (avec ou sans métastases) continuent à retenir l'attention des chercheurs. De nombreux travaux sont menés pour améliorer la prise en charge de ce cancer et augmenter la survie des patients.

Pendant quelques dizaines d'années, le principal médicament utilisé dans le traitement des CCR métastatiques a été le 5 Fluorouracile (5-FU).

Le 5-FU est un antimétabolite pyrimidique qui agit principalement sur la synthèse d'ADN (Acide Désoxyribonucléique) sous forme de 5 fluorodésoxy-uracile monophosphate (5-FdUMP) en bloquant l'activité de la thymidylate synthase. De plus, un autre de ses métabolites 5-fluorouridine triphosphate (5-FUTP) a la capacité de s'incorporer dans divers types d'Acide RiboNucléique (ARN). La transcription se fera de manière erronée.

L'ajout au 5-FU d'acide folinique, d'Oxaliplatine et d'Irinotécan a permis d'améliorer le taux de réponse (RR), la survie sans progression (PFS) et la survie globale (OS) chez les patients atteints d'un CCR métastatique [Grothey *et al*, 2005] (Figure 8).

L'Oxaliplatine est un agent alkylant synthétisé dès les années 70. Il interagit principalement au niveau de l'ADN, induisant des lésions primaires (adduits) qui bloquent sa réplication et sa transcription en ARN. Le type le plus fréquent d'adduits est représenté par les ponts intrabrin, qui établissent des liaisons covalentes irréversibles entre deux résidus guanines. L'Oxaliplatine fait partie du protocole FOLFOX, qui est largement utilisé dans le traitement des CCR (FOLFOX = Oxaliplatine + acide folinique + 5-FU).

L'Irinotécan est un dérivé hémisynthétique de la camptothécine. Il s'agit d'un agent antinéoplasique qui agit comme inhibiteur spécifique de l'ADN topo-isomérase 1, qui entraîne des cassures de l'ADN simple brin en bloquant la réplication de l'ADN. L'Irinotécan fait partie du protocole FOLFIRI, qui est largement utilisé dans le traitement des CCR (FOLFIRI = Irinotécan + acide folinique + 5-FU). [Vanhoefler *et al*, 2001].

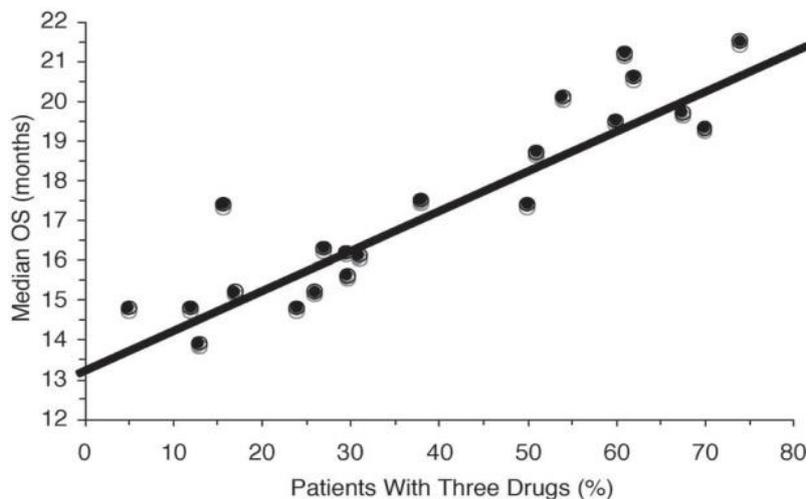


Figure 8 : Relation entre l'OS et le pourcentage de patients recevant du 5-FU, de l'Irinotécan et de l'Oxaliplatine. Il existe un lien entre l'OS et le nombre d'agents cytotoxiques utilisés ; l'OS augmente chez les patients recevant du 5-FU, de l'Irinotécan et de l'Oxaliplatine [Grothey *et al*, 2005].

I.1.7.1. Les chimiothérapies avec les cytotoxiques traditionnels

Pour les patients avec des métastases plus limitées et accessibles par chirurgie (foie, poumon), le but de l'utilisation de la chimiothérapie est également d'obtenir une résécabilité des foyers tumoraux.

Pour le traitement du CCR métastatique, une association de plusieurs agents cytotoxiques doit être envisagée afin d'obtenir un contrôle de la maladie, une stabilisation, voire une régression.

Actuellement le traitement de première ligne d'un CCR est assez agressif pour la tumeur et comporte au minimum deux agents cytotoxiques. Dans le protocole FOLFOX, l'Oxaliplatine est associée au 5-FU tandis que dans le protocole FOLFIRI, c'est l'Irinotécan qui est associé au 5-FU.

L'association de 5-FU (ou de sa prodrogue) avec l'Oxaliplatine ou l'association de 5-FU avec l'Irinotécan constituent les principaux traitements utilisés en première ligne contre les CCR métastatiques. Le choix entre l'Oxaliplatine ou l'Irinotécan dépend de l'état physiopathologique du patient au regard des toxicités pouvant être rencontrées.

Les études ont montré que l'utilisation du protocole FOLFIRI *versus* FOLFOX ne change pas énormément les PFS et OS [Tournigand *et al*, 2004] (Figure 9).

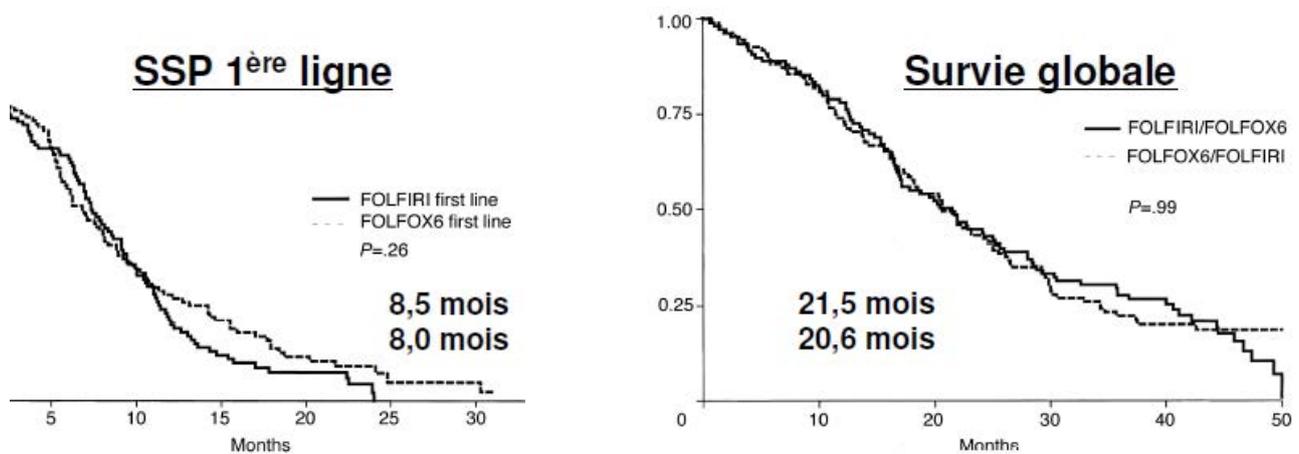


Figure 9 : Comparaison entre les protocoles FOLFOX versus FOLFIRI dans la première ligne de traitement de CCR. Cette étude a montré que les 2 protocoles ne donnent pas une énorme différence en matière de PFS (8.5 vs 8.0) et OS (21.5 vs 20.6) [Tournigand *et al*, 2004].

L'utilisation de trois agents de chimiothérapie a également été envisagée, notamment dans le protocole FOLFOXIRI et FOLFIRINOX (5-FU, Oxaliplatine et Irinotécan). Dans une étude de phase III réalisée en 2007, les taux de réponse complets et partiels, le taux de résection complète, la PFS et l'OS ont été significativement améliorés par rapport au protocole FOLFIRI [Falcone *et al* 2007]. Cependant, une autre étude tend à prouver le contraire, avec aucun bénéfice significatif de l'utilisation du protocole FOLFOXIRI par rapport au protocole FOLFIRI [Souglakos *et al*, 2006].

I.1.7.2. Anticorps monoclonaux, protéines de fusion recombinantes et inhibiteurs de kinases utilisés dans le traitement des CCR métastatiques

En 1975, Kohler et Milstein ont découvert la technique des hybridomes qui a permis la production d'anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre une cible unique.

Parmi les anticorps monoclonaux actuellement sur le marché, plusieurs spécialités ont été développées en cancérologie, dont 5 ciblent directement ou indirectement les récepteurs à tyrosine kinase. On compte parmi ces 5 spécialités deux anticorps anti EGFR : Cetuximab (Erbix[®]) et Panitumumab (Vectibix[®]) ; un anticorps anti HER2 : Trastuzumab (Herceptin[®]) et un anticorps anti VEGF : Bevacizumab (Avastin[®]). Ces biothérapies ciblent spécifiquement les récepteurs aux facteurs de croissance épidermiques (EGF) (Panitumumab, Cetuximab) ou les facteurs vasculaires endothéliaux (VEGF) (Bevacizumab, Aflibercept).

Les molécules anti EGFR utilisées en association avec la chimiothérapie dans le traitement des CCR métastatiques sont des anticorps monoclonaux spécifiquement dirigés contre le récepteur à l'EGF (EGFR).

I.1.7.3. Le Panitumumab

Le premier anticorps monoclonal anti EGFR qui a été obtenu était le Panitumumab, commercialisé sous le nom de Vectibix[®] par le laboratoire AMGEN, à partir d'une lignée cellulaire de mammifère par la technique de l'ADN recombinant.

En 2014, il a été montré que les patients portant les mutations sur les exons 2, 3 et 4 de *KRAS* répondent moins bien à un traitement par l'association Panitumumab/FOLFOX4 qu'à un traitement FOLFOX4 seul [Douillard *et al*, 2014] (Figure 10).

En revanche, les patients sauvages dits « *wild-type* », c'est-à-dire ne portant pas de mutation sur les exons 2, 3 et 4 de *KRAS* répondent mieux au traitement Panitumumab/FOLFOX4 qu'au traitement FOLFOX4 seul [Douillard *et al*, 2014] (Figure 10) (Figure 11).

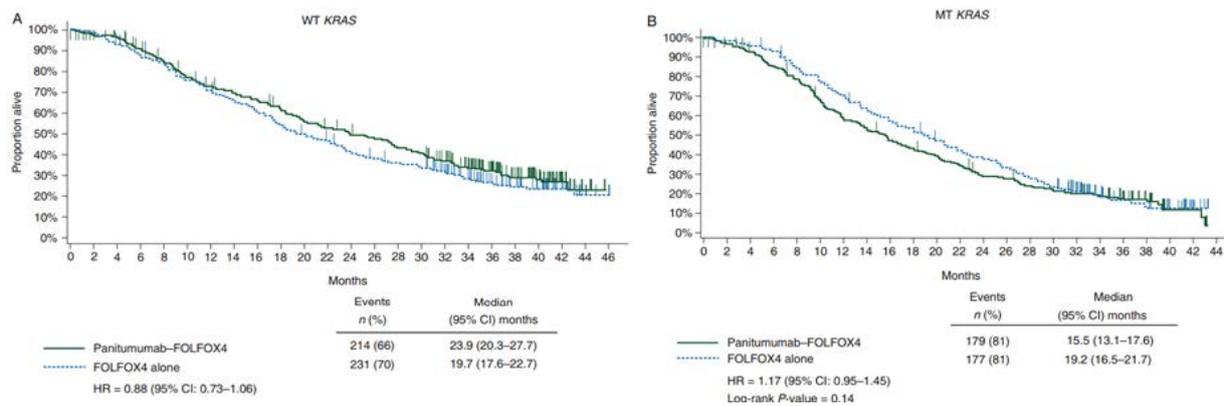


Figure 10 : Comparaison de survie globale entre les 2 traitements : Panitumumab/FOLFOX4 et FOLFOX4, chez les patients avec des CCR métastatiques portant ou pas les mutations sur l'exon 2 du gène *KRAS*.
Figure A : La survie globale chez les 445 patients avec un CCR *wild-type*. Le temps de survie global pour Panitumumab-FOLFOX4 compris entre 20.3 et 27.7 mois (moyenne : 23.9 mois) et pour FOLFOX4 seul entre 17.6 et 22.7 mois (moyenne : 19.7 mois) [p = 0.17].

Figure B : La survie globale chez 256 patients avec un CCR portant les mutations sur les exons 2, 3 et 4 de *KRAS*. Le temps de survie global pour Panitumumab-FOLFOX4 compris entre 13.1 et 17.6 mois (moyenne : 15.5 mois) et pour FOLFOX4 seul entre 16.5 et 21.7 mois (moyenne : 19.2 mois) [p= 0.14] [Douillard *et al*, 2014].

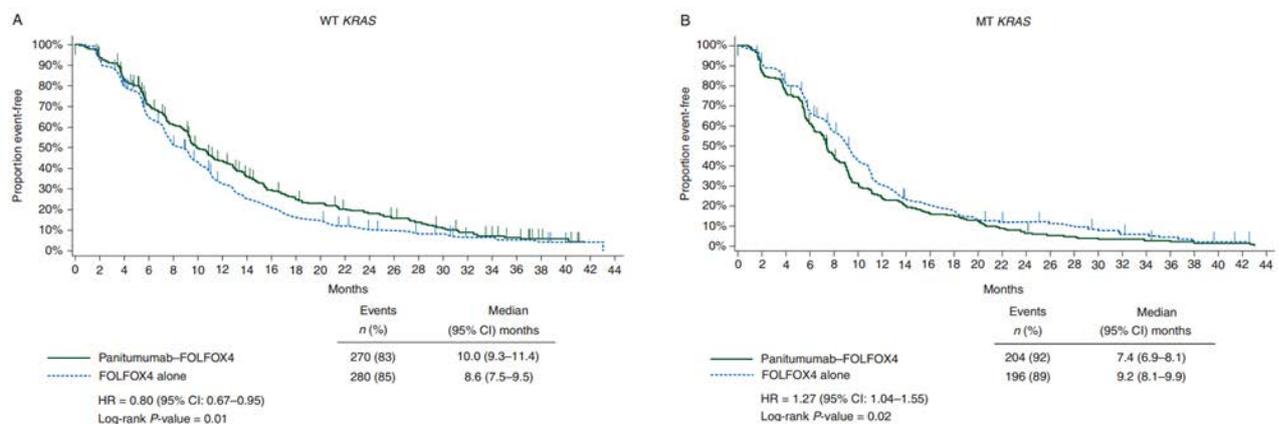


Figure 11 : Comparaison de temps de survie entre les traitements Panitumumab/FOLFOX4 et FOLFOX4, chez les patients avec des CCR métastatiques portant ou pas les mutations sur l'exon 2 du gène *KRAS*.
Figure A : La survie sans progression chez les 550 patients avec un CCR *wild-type*. Le temps de survie sans progression pour Panitumumab-FOLFOX4 compris entre 9.3 et 11.4 mois (moyenne 10.1 mois) et pour FOLFOX4 seul entre 7.5 et 9.5 mois (moyenne : 8.6 mois) [p = 0.008].

Figure B : La survie sans progression chez 400 patients avec un CCR portant les mutations sur les exons 2, 3 et 4 de *KRAS*. Le temps de survie global pour Panitumumab-FOLFOX4 compris entre 6.8 et 8.1 mois (moyenne : 7.4 mois) et pour FOLFOX4 seul entre 8.1 et 9.9 mois (moyenne : 9.2 mois) [p = 0.005] [Douillard *et al*, 2014].

La présence ou l'absence des mutations RAS a une grande influence sur l'efficacité de Panitumumab dans l'organisation du traitement du CCR (Figure 12).

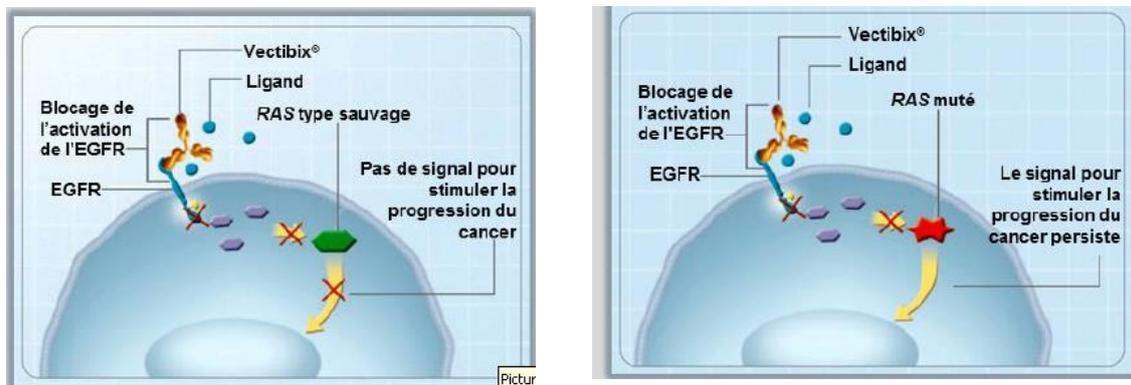


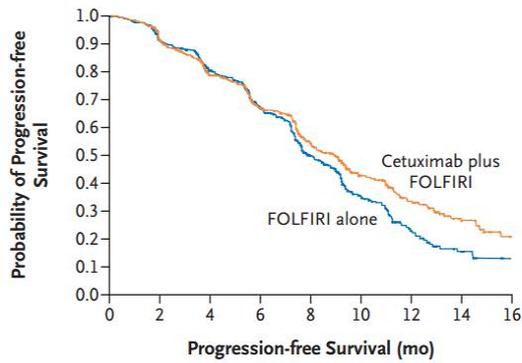
Figure 12 : Rôle du RAS dans le mécanisme d'action du Panitumumab. Le Panitumumab bloque l'activation de l'EGFR. Avec le RAS de type sauvage (*wild-type*), le traitement par Panitumumab se traduit par l'inhibition du signal à l'origine de la prolifération, de l'angiogenèse et de la formation de métastases. Lorsque les gènes RAS sont mutés, Panitumumab n'a aucun effet car les gènes *KRAS* ou *NRAS* produisent alors des intermédiaires protéiques déviants, transmettant en continu des signaux actifs en aval de l'EGFR, même si le récepteur EGFR est inhibé [Douillard *et al*, 2014].

I.1.7.4. Le Cetuximab

Le Cetuximab est un anticorps monoclonal chimérique anti EGFR de type IgG₁, qui a été commercialisé sous le nom Erbitux® par les laboratoires Merck-Serono. Il a d'abord été utilisé chez tous les patients atteints d'un CCR puis, comme le Panitumumab, son indication a été restreinte d'abord aux patients *wild-type* pour les codons 12 et 13 de *KRAS*, puis aux patients « *super wild-type* », sans mutation sur les exons 2, 3 et 4 de *KRAS* et *NRAS*.

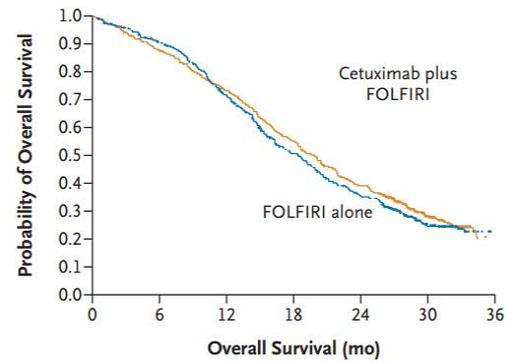
L'étude CRYSTAL a observé l'intérêt de l'association du Cetuximab au protocole de type FOLFIRI chez les patients atteints d'un CCR métastatique. Cette étude a montré que l'ajout de Cetuximab chez les patients était significativement bénéfique sur la survie sans progression mais pas sur la survie globale [Van Cutsem *et al*, 2009], (Figure 13).

A Primary Analysis Population



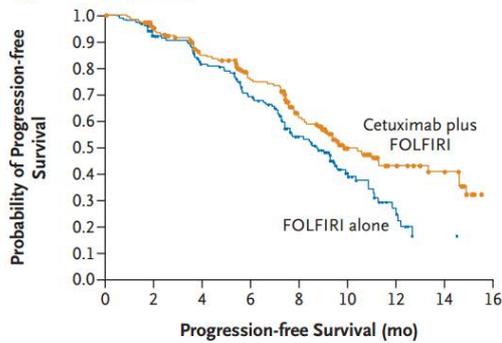
No. at Risk		0	2	4	6	8	10	12	14	16
Cetuximab plus FOLFIRI	599	499	392	298	196	103	58	29	12	
FOLFIRI alone	599	492	402	293	178	83	35	16	7	

Primary Analysis Population



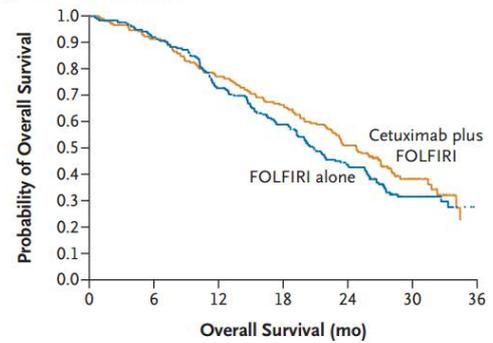
No. at Risk		0	6	12	18	24	30	36
Cetuximab plus FOLFIRI	599	519	426	319	219	83	10	
FOLFIRI alone	599	535	413	282	196	69	11	

C Wild-Type-KRAS Population



No. at Risk		0	2	4	6	8	10	12	14	16
Cetuximab plus FOLFIRI	172	151	126	101	71	42	26	16	6	
FOLFIRI alone	176	146	121	97	65	29	10	4	3	

Wild-Type-KRAS Population



No. at Risk		0	6	12	18	24	30	36
Cetuximab plus FOLFIRI	172	155	129	110	83	27	5	
FOLFIRI alone	176	160	125	98	72	24	7	

Figure 13 : Comparaison de survie sans progression et de survie globale, chez les patients avec un CCR avec ou sans présence des mutations, avec le traitement FOLFIRI et Cetuximab/FOLFIRI. Figure A : La survie sans progression chez 1198 patients avec un CCR. Le temps de survie sans progression pour le Cetuximab/FOLFIRI est compris entre 8.0 et 9.5 mois (moyenne : 8.9 mois) et pour FOLFIRI seul entre 7.6 et 9.0 mois (moyenne : 8.0 mois), [p = 0.048].

Figure B : La survie globale chez 1198 patients avec un CCR. Le temps de survie globale pour le Cetuximab/FOLFIRI est compris entre 18 et 21.3 mois (moyenne : 19.9 mois) et pour FOLFIRI seul entre 16.6 et 19.8 mois (moyenne : 18.6 mois) [p = 0.31].

Figure C : La survie sans progression chez 348 patients avec un CCR *wild type*. Le temps de survie sans progression pour le Cetuximab/FOLFIRI est compris entre 8.7 et 14.6 mois (moyenne : 9.9 mois) et pour FOLFIRI seul entre 7.4 et 9.9 mois (moyenne : 8.7 mois) [p = 0.02].

Figure D : La survie globale chez 348 patients avec un CCR *wild type*. Le temps de survie globale pour le Cetuximab-FOLFIRI est compris entre 18 et 21.3 mois (moyenne : 19.9 mois) et pour FOLFIRI seul entre 22.2 et 27.8 mois (moyenne : 21 mois) [Van Cutsem et al, 2009].

I.1.7.5. Le Bevacizumab

Le Bevacizumab, commercialisé sous le nom Avastin® par le laboratoire Roche, est un anticorps monoclonal de type IgG₁ spécifiquement dirigé contre le facteur de croissance vasculaire de type A (VEGF A). La capture du VEGF par le Bevacizumab va empêcher l'activation des récepteurs au VEGF (VEGFR-1 et VEGFR-2), ce qui confère à cette molécule une activité antiangiogénique. Le Bevacizumab est utilisé en association avec la chimiothérapie dans le traitement de première ligne des CCR métastatiques, mais également dans les cancers du sein, les cancers rénaux, les cancers de l'ovaire et les cancers bronchiques.

L'étude E3200, combinaison du Bevacizumab avec l'Oxaplatine, le 5-FU et l'acide folinique (FOLFOX4) en seconde ligne de traitement chez les patients atteints d'un CCR métastatique a démontré un bénéfice significatif sur la survie globale (12.9 mois avec bevacizumab + FOLFOX4, 10.8 mois avec FOLFOX4 seul et 10.2 mois avec Bevacizumab seul, [p= 0.0011] et sur la survie sans progression (7.3 mois avec Bevacizumab + FOLFOX4, 4.7 mois avec FOLFOX4 seul et 2.7 mois avec Bevacizumab seul, [P<0.001]). Les effets indésirables les plus fréquents du Bevacizumab ont été l'hypertension, des saignements et des vomissements [Giantonio *et al*, 2007].

L'étude ML18147 a montré que le maintien du Bevacizumab en seconde ligne après une première ligne de chimiothérapie en comportant déjà a prolongé significativement la survie globale (11.2 mois avec Bevacizumab, 9.8 mois sans Bevacizumab, [p = 0.0062]) et la survie globale sans progression (5.7 mois avec Bevacizumab, 4.1 mois sans Bevacizumab, [p<0.001]) et cela indépendamment du statut mutationnel du gène *KRAS* [Bennouna *et al*, 2013], [Petrelli *et al*, 2013].

Enfin, l'utilisation du protocole FOLFIRINOX en association avec le Bevacizumab s'est révélée prometteuse chez des patients réfractaires aux autres thérapeutiques, avec notamment une survie globale de 11.9 mois [Chaix *et al*, 2014].

A ce jour, il n'existe pas de biomarqueur validé prédictif de réponse au Bevacizumab.

I.1.7.6. L'Aflibercept

L'Aflibercept, commercialisé sous le nom Zaltrap[®] par les laboratoires Sanofi, est une protéine de fusion issue du génie moléculaire capable d'emprisonner le VEGF de type A et B. Cette molécule possède l'AMM en seconde ligne de traitement du cancer colorectal métastatique.

L'étude VELOUR a montré que l'ajout de l'Aflibercept à un protocole de type FOLFIRI en seconde ligne, après une première ligne contenant de l'Oxaliplatine, permet d'augmenter de manière significative la survie sans progression (6.9 mois avec Aflibercept + FOLFIRI, 4.67 mois avec FOLFIRI seul, [p<0.001]) et la survie globale (13.5 mois avec Aflibercept + FOLFIRI, 12.6 mois FOLFIRI seul, [p = 0,0032]) [Van Cutsem *et al*, 2012].

Comme pour le Bevacizumab, il n'existe pas à ce jour de biomarqueur prédictif validé de réponse au traitement.

I.1.7.7. Regorafenib

Le Régorafenib est un inhibiteur de tyrosine kinase multicible (VEGF 1, 2 et 3, TIE2, RET, RAF-1, BRAF, PDGFR et FGFR). Il est commercialisé sous le nom de Stivarga[®] par le laboratoire Bayer Pharma.

Il est aujourd'hui indiqué en troisième ligne de traitement dans les CCR métastatiques suite aux résultats de l'étude CORRECT qui comparait son utilisation à des soins de support chez des patients en dernière ligne de traitement. La survie globale s'est révélée significativement meilleure chez les patients traités par Régorafenib (6.4 mois avec Régorafenib, 5.0 mois placebo, [p = 0,0052]) [Grothey *et al*, 2013].

Il n'existe pas à ce jour de biomarqueur prédictif validé de réponse au traitement.

I.1.7.8. Influence de l'évolution des traitements sur la survie globale chez les patients atteints d'un CCR métastatique

En 30 ans, l'évolution des traitements du CCR métastatique a permis d'augmenter la survie globale de manière considérable. Etant une maladie avec un pronostic très sombre avec une espérance de survie courte de l'ordre de 6 mois, les dernières études font désormais état d'une survie globale dépassant les 30 mois (Figure 14).

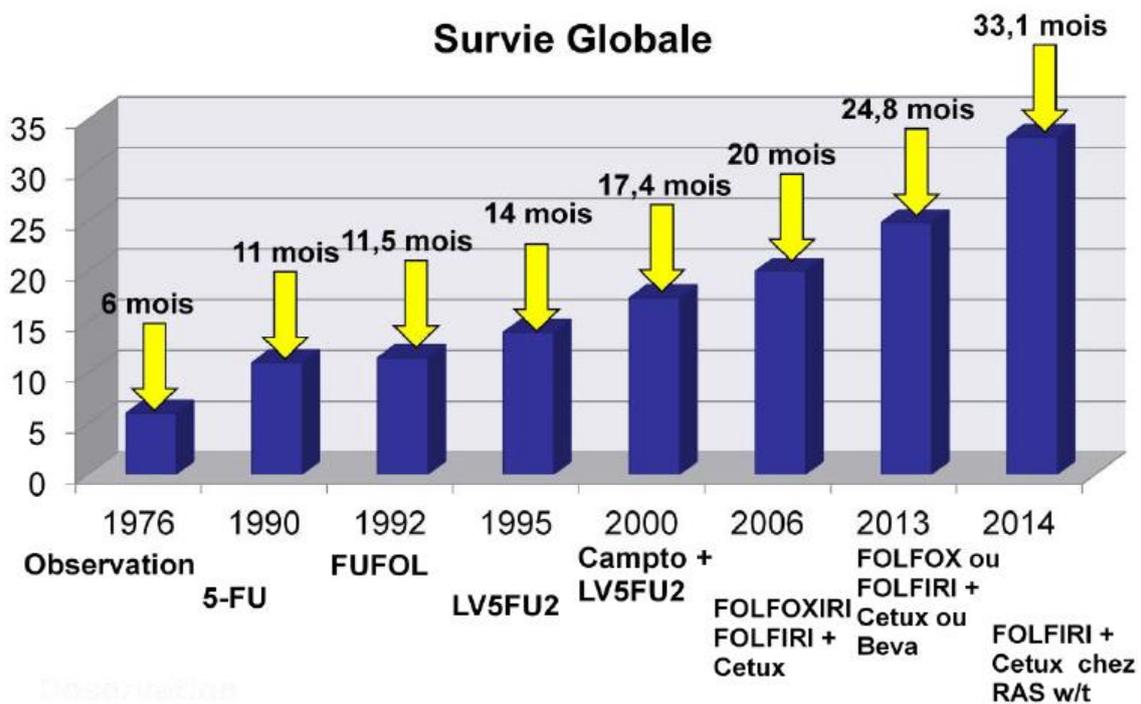


Figure 14 : Evolution de la survie globale de 1976 à nos jours. L'utilisation d'une mono chimiothérapie, puis l'association de plusieurs cytotoxiques et enfin de thérapies ciblées ont permis de multiplier quasiment par 6 la survie globale médiane des patients atteints de CCR métastatiques [Harlé Alexandre, thèse, 2014].

I.1.7.9 La prise en charge standard actuelle du cancer colorectal métastatique

La prise en charge du CCR est faite actuellement selon le statut RAS (présence ou absence des mutations *KRAS*, *NRAS* et *BRAF*).

En première ligne, pour les patients en bonne forme physique, le traitement combine d'emblée la chimiothérapie à une thérapie ciblée (antiangiogénique ou anti EGFR pour les patients RAS sauvage). En matière de chimiothérapie, les protocoles à base de fluoropyrimidine (5-FU notamment) en association avec un inhibiteur de topoisomérase (Irinotécan) tel que FOLFIRI, ou de platine (Oxaliplatine) tel que FOLFOX sont le plus couramment utilisés. Le choix entre les protocoles FOLFOX ou FOLFIRI est essentiellement dicté par la thérapie ciblée qui sera associée à la chimiothérapie ainsi qu'à l'appréciation du praticien ; en revanche, si en première ligne les patients ont eu le FOLFOX, ils recevront le plus souvent FOLFIRI en deuxième ligne, et vice versa.

Chez les patients qui présentent les mutations *KRAS* et/ou *NRAS*, la chimiothérapie (FOLFOX ou FOLFIRI) est systématiquement combinée au Bevacizumab (anti VEGF) (PFS: 10,6 mois ; OS: 20,3 mois), les anti EGFR ne sont pas efficaces dans ces sous-groupes.

Chez les patients RAS sauvage (les patients qui ne présentent pas les mutations *KRAS* et/ou *NRAS*) le traitement consiste en la combinaison de la chimiothérapie au Bevacizumab (anti VEGF) ou au Cetuximab (anti EGFR). L'étude AIO KRK-0306 a montré que les patients RAS sauvage présentent une réponse similaire (même efficacité en matière de PFS et OS) quelle que soit la combinaison initialement retenue. De façon intéressante, d'autres études ont montré que Bevacizumab en association avec la chimiothérapie est plus efficace pour les cancers du côlon droit alors que le Cetuximab associé à la chimiothérapie est plus efficace pour les cancers localisés au niveau du côlon gauche.

Pour les patients présentant les mutations *BRAF*, le protocole de chimiothérapie le plus souvent utilisé est le FOLFOXIRI : une tripléte de chimiothérapie (5FU + Oxaliplatine + Irinotécan) si, bien sûr, l'état du patient le permet étant donné l'agressivité de ce sous-type de CCR. Dans l'étude PRIME il a été notamment montré que ce protocole est plus efficace que FOLFOX ou FOLFIRI (PFS : 5.5 mois *versus* 7.5). Pour ces patients le standard de traitement en première ligne est la combinaison de FOLFOXIRI avec Bevacizumab (PFS : 7,5 mois; OS : 19,0 mois) (Tableau 1).

En deuxième ligne le traitement est réalisé en combinant la chimiothérapie avec la thérapie ciblée (antiangiogénique ou anti EGFR pour les patients RAS sauvage).

Chez les patients qui présentent les mutations *KRAS* et/ou *NRAS* la chimiothérapie est systématiquement combinée au Bevacizumab (Avastin®) ou à l'Aflibercept (Zaltrap®) (anti VEGF), alors que les anti EGFR ne sont pas efficaces dans ces sous-groupes.

Chez les patients RAS sauvage le choix de traitement est lié au traitement que le patient a eu en première ligne :

- Les patients ayant eu en première ligne la combinaison de chimiothérapie avec Bevacizumab peuvent bénéficier de la chimiothérapie (FOLFOX ou FOLFIRI) avec Cetuximab ou la chimiothérapie avec Bevacizumab
- Les patients ayant eu en première ligne une chimiothérapie avec Cetuximab auront en deuxième ligne une chimiothérapie combinée avec Bevacizumab (Figure 17).

Les patients présentant les mutations *BRAF* auront en deuxième ligne un anti EGFR +/- chimiothérapie. La chimiothérapie est allégée et à la place du protocole FOLFOX ou FOLFIRI, l'Irinotécan ou l'Oxaliplatine seuls seront administrés (Irinotécan le plus souvent). Cet allègement de la chimiothérapie est expliqué par le mauvais pronostic, (en général l'état de santé de ces patients est bien dégradé déjà en deuxième ligne) (Tableau 1).

En troisième ligne le traitement du CCR métastatique chez les patients *KRAS* muté et *BRAF* muté est réalisé essentiellement avec Régorafenib (Stivarga®) ou TAS-102 (Lonsurf®) combinant cette thérapie avec la thérapie support (*Best Supportif Care*).

Chez les patients RAS sauvage le choix de traitement est également Régorafenib (Stivarga®) ou TAS-102 (Lonsurf®) ; en revanche en troisième ligne, si l'état de santé du patient le permet, il est envisageable d'administrer le Cetuximab en le combinant avec la chimiothérapie (Irinotecan essentiellement) (Tableau 1).

Tableau 1 : Prise en charge standard du CCR métastatique. Les différentes études réalisées pour mettre en évidence l'efficacité des différents protocoles existants pour la réalisation de traitements de CCR métastatiques. Globalement le tableau montre que les anti EGFR sont efficaces en cas de CCR métastatique RAS *Wild type* tandis que Bevacizumab en combinaison avec les protocoles FOLFOX/FOLFIRI est efficace sans tenir compte du statut RAS de cancer.

	 RAS status mutated	 RAS status : wild-type	 BRAF status mutated
1st-line	FOLFOX or FOLFIRI + Bevacizumab (Avastin®) [PFS: 10,6 mo; OS: 20,3 mo]	FOLFIRI or FOLFOX + Bevacizumab (Avastin®) [PFS: 10,6 mo; OS: 20,3 mo]	FOLFOX or FOLFIRI + Cetuximab (Erbix®) or Panitumumab (Vectibix®) [PFS: 8,5 mo; OS: 23,0 mo]
2nd-line	FOLFOX or FOLFIRI + Bevacizumab (Avastin®) or Afibercept (Zaltrap®)	FOLFOX or FOLFIRI + Cetuximab (Erbix®) or Panitumumab (Vectibix®) [PFS: 7 mo; OS: 18 mo]	FOLFOX or FOLFIRI + Bevacizumab (Avastin®) or Afibercept (Zaltrap®) [PFS: 9,2 mo; OS: 21,4 mo]
3rd-line	Regorafenib (Stivarga®) or TAS-102 (Lonsurf®) [PFS: 2 mo; OS: 7 mo]	Regorafenib (Stivarga®) or TAS-102 (Lonsurf®) [PFS: 2 mo; OS: 7 mo]	Cetuximab (Erbix®) or Panitumumab (Vectibix®) + Irinotecan (Campto®) [PFS: 2 mo; OS: 7 mo]
4th-line	Regorafenib (Stivarga®) or TAS-102 (Lonsurf®)	Regorafenib (Stivarga®) or TAS-102 (Lonsurf®)	Regorafenib (Stivarga®) or TAS-102 (Lonsurf®)

I.2.Oncogénèse colorectale

I.2.1. Les mécanismes de cancérogénèse dans le CCR

Le CCR possède trois formes majeures :

- Héritaire
- Sporadique
- Familiale

Les mécanismes sous-jacents de la forme familiale ne sont pas bien étudiés, en revanche de nombreux travaux ont montré que dans les formes héréditaires et sporadiques des mutations somatiques jouent un grand rôle (*sequential genetic and molecular events*) [Jatin *et al*, 2013].

Trois mécanismes de cancérogénèse ont été identifiés dans le CCR, se traduisant par 3 phénotypes tumoraux différents mais impliquant finalement des voies de signalisation identiques.

Les 3 phénotypes tumoraux sont :

- Phénotype CIN (*chromosomal instability*)
- Phénotype MSI (*microsatellite instability*)
- Phénotype CIMP (*CpG island methylator*) [Markowitz *et al*, 2009].

I.2.1.1. Le phénotype CIN

Le phénotype CIN correspond à 80% des CCR sporadiques. De nombreuses études ont montré que le CCR peut progresser à partir d'un adénome ou à partir de grands polypes bénins.

La première étape de cancérogénèse du CCR est la formation de cryptes aberrantes ; pendant cette étape il y a une activation de la voie *Wnt*. Cette étape se traduit par des pertes alléliques localisées sur le bras court des chromosomes 17 et 8 et sur le bras long des chromosomes 18 et 22. Ces pertes, associées à des mutations fréquentes dans les mêmes régions, entraînent une inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs tels que le gène *APC*, localisé sur le bras long du chromosome 5, le gène *TP53* localisé sur le bras court du chromosome 17 et le gène *KRAS* [Pino *et al*, 2010] (Figure 15).

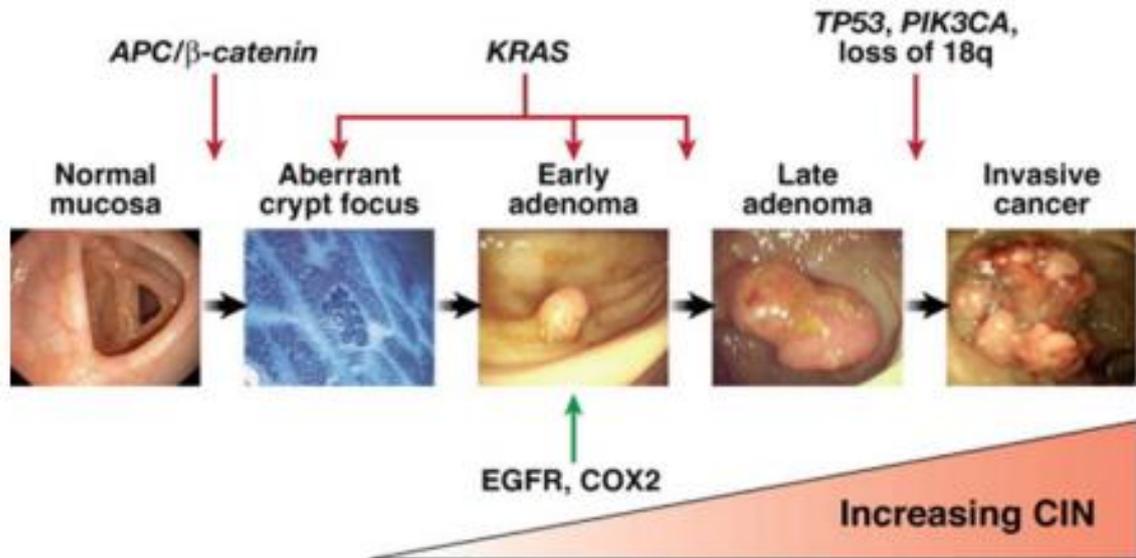


Figure 15 : Les étapes de cancérogénèse du cancer colorectal. La progression d'un adénome vers un carcinome (cancérogénèse) commence par l'apparition de cryptes aberrantes (ACF) et progresse jusqu'à la formation d'un cancer invasif [Pino *et al*, 2010].

I.2.1.2. Le phénotype MSI

En 1993, Manuel Perucho et ses collègues ont effectué l'amplification par PCR de milliers de séquences issues de cancers du côlon et des échantillons de tissus normaux. Ces études ont montré que 12% des tumeurs avaient des bandes plus courtes que les autres. Ces bandes contenaient des éléments simples et répétitifs (microsatellites), principalement la polyadénine (A_n).

Des études ont montré que ces tumeurs se situent principalement dans le côlon proximal, elles sont moins invasives, moins susceptibles de contenir des mutations *KRAS* ou *TP53*, ont une faible différenciation et elles ont été trouvées chez des patients plus jeunes [Ionov *et al*, 1993].

Parallèlement, le laboratoire de Stephen Thibodeau a montré des délétions des séquences $[CA]_n$ dans les chromosomes 5q, 15q, 17p et 18q [Thibodeau *et al*, 1993].

Par ailleurs, d'autres études ont montré que le phénotype MSI est caractérisé par une instabilité des locus microsatellites secondaires ayant un défaut de réparation des mésappariements de l'ADN ou système MMR (*mismatch repair*).

Les tumeurs MSI représentent 15% des CCR. Dans le cadre des CCR sporadiques, la cause de ce phénotype est une hyperméthylation du gène *hMLH1*, alors que dans le syndrome de Lynch, l'altération du système MMR est consécutive à une mutation inactivatrice constitutive d'un des gènes suivants : *hMSH2*, *hMLH1*, *hMSH6* et *PMS2* [Shia *et al*, 2008].

Le déficit du système de réparation MMR entraîne une apparition de mutations secondaires au niveau de ces séquences répétées codantes d'un certain nombre de gènes. Il a été mis en évidence la présence d'insertion ou de délétion conduisant à des décalages du cadre de lecture dans des gènes impliqués dans des voies de contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la réparation de l'ADN, tels que *TGFR2*, *BAX* et les facteurs de transcription *TCF-4* et *E2F4* [Duval *et al*, 2002] (Figure 16).

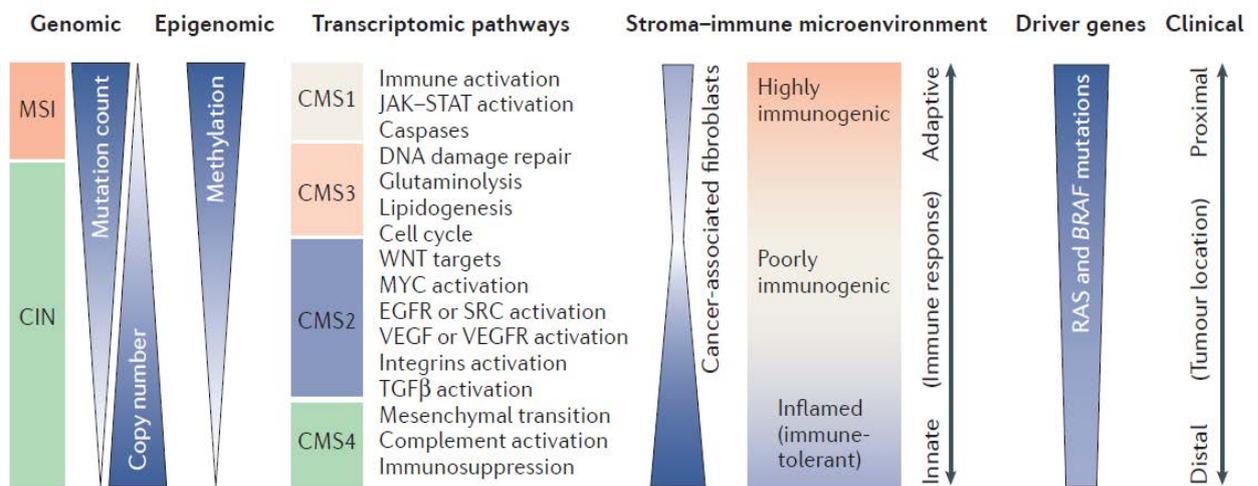


Figure 16 : Représentation des sous-types des CCR. Les MSI sont liés avec l'hyperméthylation, l'hypermutation, l'infiltration immune, l'activation des mutations de RAS et BRAF et ils sont localisés dans les parties proximales de côlon. Les tumeurs présentant le phénotype CIN sont plus hétérogènes, elles sont localisées principalement dans la partie gauche du côlon et dans le côlon rectum, et ces tumeurs sont moins immunogéniques et présentant une infiltration stromale plus marquée [Dienstmann *et al*, 2017].

I.2.1.3. Le phénotype CIMP

Le phénotype CIMP correspond à une hyperméthylation des cytosines des îlots CpG des régions promotrices des gènes entraînant une inactivation transcriptionnelle de gènes suppresseurs de tumeurs, tel que le gène *p16INK4A*.

Les enzymes responsables de la méthylation de l'ADN sont les ADN méthyltransférases (DNMT), dont des taux élevés ont été mis en évidence dans les cellules tumorales coliques. Parmi ces différents phénotypes de tumeurs, des voies de signalisation intracellulaires sont activées et peuvent être identiques.

I.2.2. Signalisation cellulaire dans les CCR

I.2.2.1. Les voies de signalisations de l'EGFR

Les récepteurs de la famille HER (*Human Epidermal Receptors*) jouent un rôle déterminant dans les mécanismes de cancérisation des cellules et ils sont parmi les premiers oncogènes identifiés.

Dans cette famille, il existe 4 récepteurs homologues. Les récepteurs HER-1 (ou EGFR ou encore C-erbB), HER-2 (ou C-erbB2), HER-3 (ou C-erbB3) et HER-4 (ou C-erbB4). Ces récepteurs sont des récepteurs transmembranaires présentant un domaine N-terminal extracellulaire portant le site de fixation du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal intracellulaire qui porte l'activité tyrosine kinase.

De nombreux ligands des récepteurs HER ont été identifiés. En particulier, EGF, TGF α (*Transforming Growth Factor*), des amphirégulines, des épirégulines, des facteurs de croissance pour HER-1 et des hérégulines pour HER-3 et HER-4. Pour HER-2 aucun ligand n'a été identifié [Linardou *et al*, 2009] (Figure 17).

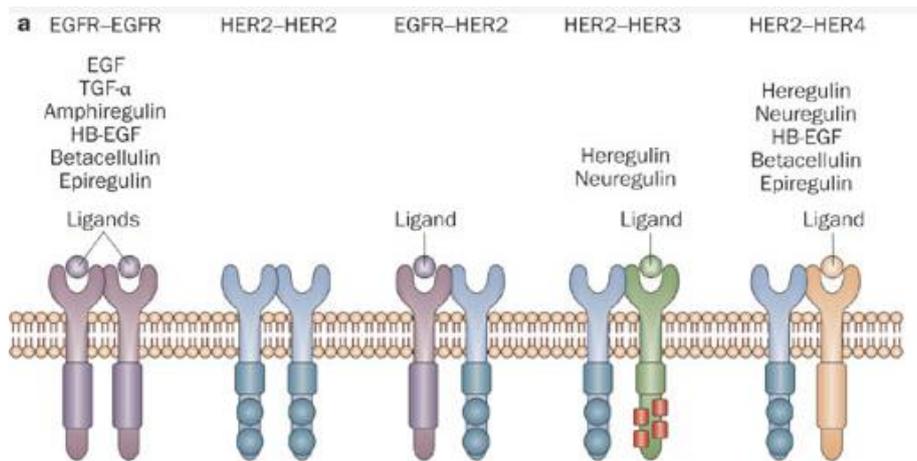


Figure 17 : Les récepteurs de la famille HER. Chaque récepteur de cette famille comporte un domaine extracellulaire, qui forme des liaisons avec des ligands, un domaine lipophile transmembranaire et un domaine intracellulaire avec une activité tyrosine kinase. Aucun ligand n'a été identifié pour les récepteurs HER2 [Linardou *et al*, 2009].

Le récepteur à l'EGF (EGFR) ou HER1 ou C-erbB est un récepteur transmembranaire ayant un rôle important dans le développement des tissus d'origine épithéliale ; en revanche les récepteurs HER2, HER3 et HER4 ont un rôle dans le développement des tissus nerveux et musculaires squelettiques [Singh *et al*, 2005].

L'activation d'EGFR active la prolifération et la motilité cellulaire, diminue l'apoptose. L'EGFR joue également un rôle dans le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse, dans la régulation des métalloprotéines matricielles et aussi dans les phénomènes d'angiogenèse tumorale grâce à son rôle de régulation du VEGF-A (*Vascular endothelial growth factor*) [Mendelsohn *et al*, 2006].

HER1 est une glycoprotéine transmembranaire de 170 kDa qui comporte 3 domaines distincts : un domaine extracellulaire de 621 acides aminés, il possède un site de fixation du ligand du récepteur et deux domaines riches en Cystéine, un domaine transmembranaire de 23 acides aminés, qui comporte une hélice alpha et un domaine intracellulaire de plus de 540 acides aminés, qui possède une activité tyrosine kinase.

Dans le CCR, l'expression de l'EGFR apparaît comme un facteur de mauvais pronostic, l'EGFR intervient dans le développement des tissus d'origine épithéliale.

Des inhibiteurs de kinase sont utilisés pour le traitement du cancer dans le cadre d'une thérapie ciblée, le Cetuximab et le Panitumumab sont deux anticorps monoclonaux ciblant spécifiquement EGFR et sont utilisés dans le traitement du CCR métastatique [Van Custem *et al*, 2011].

I.2.2.2. Voie des MAPKinases

La voie MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) est une voie de signalisation intracellulaire qui joue un rôle important dans la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de la migration cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse. Elle est anormalement activée dans de nombreux cancers dont le CCR. Les mécanismes d'activation de cette voie sont principalement l'activation de récepteurs membranaires tels que l'EGFR, mais aussi la survenue de mutations somatiques, notamment au niveau des gènes codant pour la protéine RAS qui est à l'origine des activités de phosphorylation de RAF, MEK et ERK [Lièvre *et al*, 2010] (Figure 18).

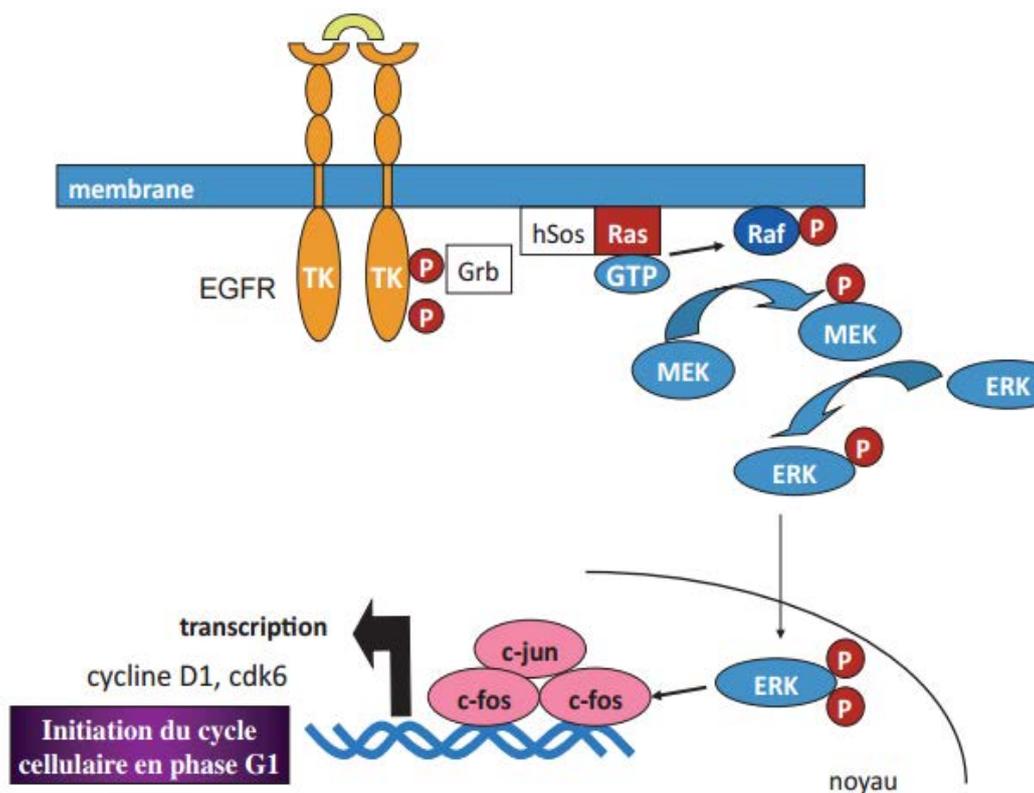


Figure 18 : Schéma de la voie RAS/MAPK. L'activation de la voie des MAPK, également appelée « ERK » (*Extracellular signal-Regulated Kinase*), débute par l'activation et le recrutement à la membrane par RAS de la protéine RAF-1. Cette première protéine kinase est responsable de l'activation par phosphorylation de la MAPK-kinase ou MEK (MAPK-ERK-Kinase). À son tour, MEK active de manière hautement spécifique, par double phosphorylation, ERK, ce qui entraîne sa translocation au niveau du noyau et l'expression de gènes précoces codants pour des facteurs de transcription (c-FOS) et autres (c-MYC, c-JUN ou JUNB) qui, à leur tour, stimulent l'expression d'un grand nombre de gènes, en particulier ceux de la cycline D1 et de cdk6 ayant un rôle majeur dans l'initiation du cycle cellulaire en G1 [Lièvre *et al*, 2010].

RAS désigne une famille de protéines à activité GTPasique. Cette famille est constituée de plus de 150 membres, divisés en cinq familles principales : RAS, RAB, ARF, RAN et RHO.

Les protéines issues de ces gènes ont un poids moléculaire de 21 000 daltons. Elles sont localisées sur la face interne de la membrane cytoplasmique, ancrées dans la couche phospholipidique membranaire par leur extrémité C terminale. Les protéines RAS jouent un rôle important dans la transmission de signaux extracellulaires provenant des récepteurs membranaires vers le noyau, aboutissant à la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de la migration cellulaire, ainsi que de l'angiogénèse (Figure 19).

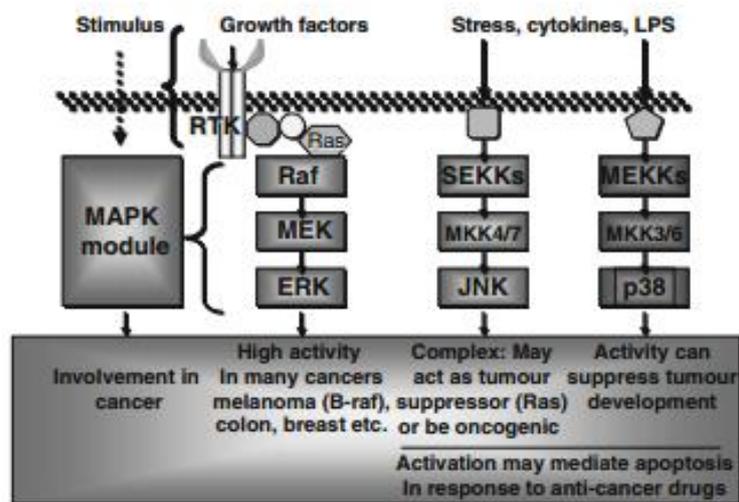


Figure 19 : Cascade de signalisation de MAPK. MAPK agit sur un grand nombre de processus qui sont impliqués dans la cancérogénèse. L'activation d'ERK génère des mutations des récepteurs tyrosines kinases, RAS GTPase et serine/thréonine kinase MAK kinase B-Raf et finalement cette voie active la signalisation JNK et la protéine p38 qui ont un grand rôle dans la régulation de l'apoptose [Keyse et al, 2008].

La protéine RAS existe sous deux états : l'état inactif lié au GDP et l'état actif, lié au GTP. La forme RAS-GTP active la protéine RAS et PI3K. L'activation de RAS va provoquer la phosphorylation de la sérinethréonine kinase RAF. L'effecteur direct de RAF est la protéine MEK (Figure 20).

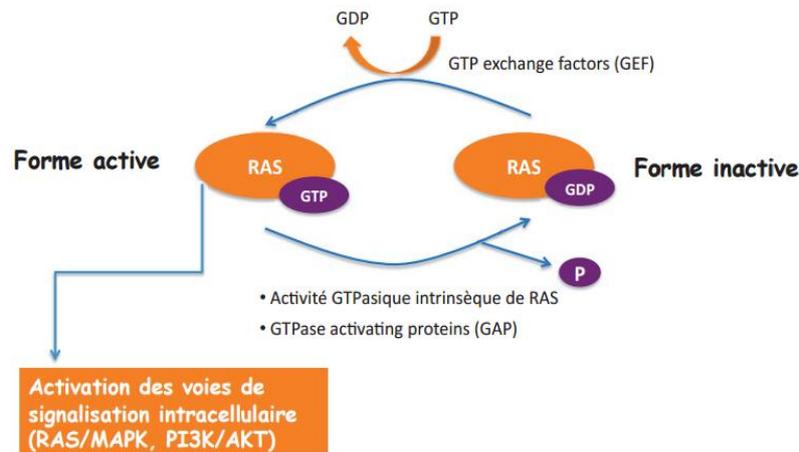


Figure 20 : Formes active et inactive de la protéine RAS. La protéine RAS existe sous deux états : l'état inactif lié au Guanosine DiPhosphate (GDP) et l'état actif, lié au Guanosine TriPhosphate (GTP). La forme RAS-GTP active la protéine RAS et Phosphoinositidine 3-kinase (PI3K) [Lièvre *et al*, 2010].

Les protéines RAS sont codées par trois gènes *HRAS*, *NRAS* et *KRAS*. Les mutations sont des mutations du gène *KRAS*, elles sont situées dans les codons 12 et 13 de l'exon 2. Ces mutations sont des mutations faux-sens ; à cause de cette mutation, il y a une substitution d'une glycine par un autre acide aminé, qui donne une altération de l'activité GTPase intrinsèque et une accumulation de protéines RAS en forme active (RAS-GTP) [Lièvre *et al*, 2008].

I.2.2.3. Voie PI3K/AKT/mTOR

La voie PI3K/AKT/mTOR est une voie de signalisation intracellulaire composée de différentes kinases activées en cascade, elle est impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire, la prolifération cellulaire, et l'angiogenèse. En effet, la plupart des protéines la constituant sont des gènes suppresseurs de tumeurs ou des proto-oncogènes, dont la mutation peut favoriser le développement d'un processus tumoral.

Parmi ces protéines, mTOR (*mammalian target of rapamycin*), est la cible d'une nouvelle famille de médicaments antitumoraux, les analogues de la rapamycine ou rapalogues, qui ont déjà obtenu des résultats prometteurs contre différents types de tumeurs. La voie PI3K/AKT/mTOR est le plus souvent activée par le biais d'un récepteur membranaire, lui-

même stimulé par un facteur de croissance membranaire et provoquant à son tour l'activation d'une cascade de phosphorylations de nombreuses protéines intracellulaires [Therkildsen *et al*, 2014] (Figure 21).

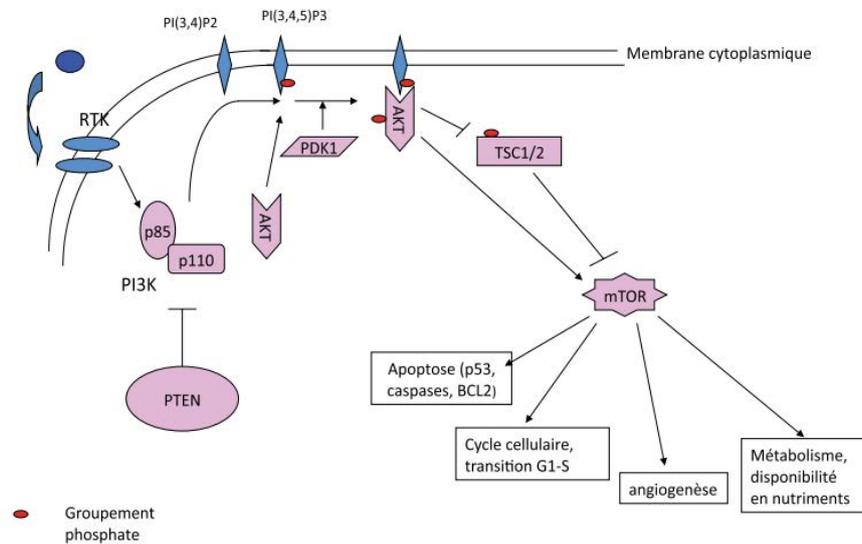


Figure 21 : Schéma de voie PI3K/AKT/mTOR. PI3K est un hétérodimère à activité kinase constitué de deux protéines : une sous-unité régulatrice p85, et une sous-unité catalytique p110. Elle peut donc être activée directement par un récepteur à tyrosine-kinase ou par l'intermédiaire de la protéine RAS, elle-même activée par mutation ou par un de ces récepteurs. PI3K peut être inhibée par PTEN (phosphatase and tensin homologe deleted on chromosome 10), dont on retrouve une diminution d'expression dans différents types de tumeurs chez l'homme. La PI3K participe à la formation d'un composé lipidique membranaire, le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate. Ce composé recrute la sérine/thréonine kinase AKT à proximité de la membrane plasmique, où elle est alors phosphorylée (et activée) par la PDK1 (phosphatidylinositol 3-dépendant kinase 1). AKT est un proto-oncogène, qui a de nombreuses cibles d'aval dont mTOR. mTOR est elle-même régulée par la sérine thréonine kinase AKT par au moins 2 mécanismes différents : par phosphorylation directe ou de manière indirecte par phosphorylation et inactivation de TSC2 (Tuberous sclerosis complex-2) mTOR est également régulé par l'état nutritionnel de la cellule, c'est-à-dire par le taux en acides aminés ou en nutriments cytoplasmiques, et par l'hypoxie. mTOR agit sur l'apoptose, le cycle cellulaire, l'angiogenèse et le métabolisme [Therkildsen *et al*, 2014].

La voie PI3K joue un rôle très important dans l'oncogénèse. Il existe de nombreuses altérations mutationnelles et non mutationnelles de cette voie. PIK3CA est une oncoprotéine majeure. Sa mutation est fréquemment rencontrée dans le cancer du côlon.

I.3. Les mutations des gènes *KRAS*, *NRAS* et *BRAF*

Depuis 2008, il est reconnu que la présence d'une mutation des codons 12 ou 13 du gène *KRAS* sur l'ADN tumoral est un facteur prédictif de résistance aux traitements anti EGFR [Benoist Chibaudel, 2015].

La présence de mutation sur les codons 12 et 13, c'est-à-dire l'exon 2 de *KRAS* représente environ 40% des cas (Figure 22). Parmi les patients dits « wild-type », c'est-à-dire dont les tumeurs ne portent pas de mutation sur l'exon 2, environ 40 à 50% ne répondent cependant pas ou mal aux anti EGFR. Ces résultats démontrent qu'il existe d'autres facteurs potentiellement impliqués dans la réponse aux anti EGFR. Ainsi, en 2013, il a été démontré qu'en plus des mutations des codons 12 et 13, la présence de mutation sur les exons 3 et 4 de *KRAS* et sur les exons 2, 3 et 4 de *NRAS*, un autre isoforme de la protéine RAS, était un facteur prédictif négatif de réponse aux anti EGFR [Macaluso et al, 2002].

L'influence de la présence de mutations sur les gènes codants pour des protéines intervenant dans la voie de signalisation des MAP Kinases ou de la voie PI3K/AKT/mTOR, a été recherchée. Ainsi, l'influence des mutations des gènes *BRAF*, *PIK3CA* ou encore de l'expression de la protéine PTEN sont des facteurs déjà très étudiés. Globalement, la présence de mutation sur *BRAF*, *PIK3CA*, tout comme sur *KRAS* ou *NRAS*, ainsi que la perte d'expression de PTEN sont des facteurs diminuant la survie globale, mais seule la présence de mutation sur les exons 2, 3 et 4 de *KRAS* ou de *NRAS* est un marqueur prédictif reconnu de réponse aux anti EGFR.

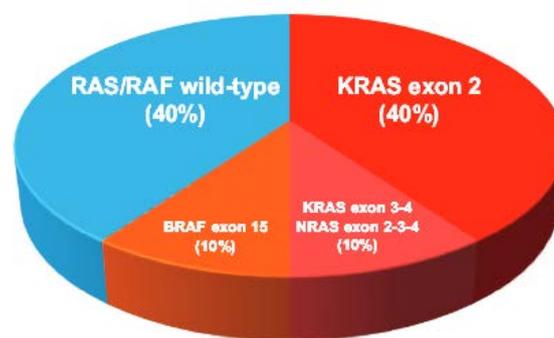


Figure 22 : Fréquence des mutations *KRAS*, *NRAS* et *BRAF* chez les patients avec CCR. La moitié des patients présentant des mutations *KRAS* et *NRAS*, c'est un biomarqueur prédictif négatif pour les récepteurs EGF, et donc cela ne permet pas de thérapie avec les anticorps monoclonaux. Seuls les patients avec RAS/RAF *wild-type* (sauvage) peuvent bénéficier d'un traitement avec les anticorps monoclonaux [Mouliere et al, 2013].

I.3.1. Mutations des gènes *KRAS* et *NRAS*

La protéine RAS est une protéine de membrane à activité GTPasique. Elle est impliquée dans la voie des MAPKinases. Il existe 4 isoformes de RAS : KRAS A, KRAS B, NRAS et HRAS, codées par les gènes *KRAS*, *NRAS* et *HRAS*.

Depuis 2009, la recherche des mutations sur les gènes *KRAS* et *NRAS* se fait systématiquement dans le cadre des prescriptions des médicaments anti EGFR.

Le gène *KRAS* se situe sur le chromosome 12 et est retrouvé muté dans de nombreux cancers. Une grande majorité des mutations de *KRAS* décrites se situent sur les codons 12 et 13 (exon 2). Les mutations recherchées aujourd'hui sur le gène *KRAS* se situent sur les exons 2, 3 et 4 avec notamment la présence de hotspots sur les codons 12, 13, 59, 61, 117 et 146 correspondant aux sites de liaison au GTP (Tableau 2).

KRAS joue un grand rôle dans le développement de tumeurs par la régulation de l'expression des protéines qui sont impliquées dans la prolifération et survie de cellule et la propagation des métastases et l'angiogenèse [Bibeau et al, 2009] (Tableau 2).

Tableau 2 : Détection de mutation *KRAS* chez les patients avec un CCR métastatique. L'équipe de Li-Chen Yen a montré que dans un groupe avec 76 patients ayant un CCR métastatique, 56.6% des patients n'ont pas de mutation du gène *KRAS*, en revanche 43.4% présentent cette mutation, le plus souvent sur les codons 12, 13 et 15 [Yen et al, 2009].

Wild type	43 (56.6%)
Mutation <i>KRAS</i>	33 (43.4%)
Codon 12	11 (33.3%)
Codon 13	9 (27.3%)
Codon 15	7 (21.2%)
Codon 18	1 (3%)
Codon 20	2 (6.1%)
Codon 30	2 (6.1%)
Codon 31	1 (3%)

Ces mutations sont dites activatrices, c'est-à-dire qu'en cas de présence de cette mutation, il y a abolition de l'activité GTPase intrinsèque. La protéine *KRAS* liée au GTP provoque alors une activation constitutive responsable d'une suractivation de la voie de signalisation des MAPKinases [Yen et al, 2009].

Le gène *NRAS* est situé sur le bras court du chromosome 1 (1p13.2). *NRAS* est retrouvé muté dans environ 10% des cas (Figure 23).

La présence d'une mutation sur les exons 2, 3 ou 4 des gènes *KRAS* ou *NRAS* est un facteur reconnu de résistance aux traitements anti EGFR (72), (41). En Europe, la recherche de mutation sur les exons 2, 3 et 4 des gènes *KRAS* et *NRAS* est ainsi obligatoire pour toute prescription d'un médicament anti EGFR. La présence d'une mutation, quelle qu'elle soit, sur l'un des exons est une contre-indication à la prescription du Cetuximab ou du Panitumumab (Figure 23).

I.3.2. Mutations du gène *BRAF*

Le gène *BRAF* est situé sur le bras long du chromosome 7 en position 34 (7q34). Ce gène code la protéine BRAF, qui se trouve en aval de la protéine KRAS dans la voie des RAS/RAF/MAPKinases. La protéine KRAS est responsable de la phosphorylation de BRAF et de son activation (Figure 23).

La mutation du gène *BRAF* est reportée dans 5 à 10% des cas de CCR, et dans 90% des cas il s'agit d'une mutation *V600E* (valine en position 600 substituée par l'acide glutamique) [Chapman *et al*, 2011].

Dans les mélanomes métastatiques, la présence d'une mutation *V600E* sur le gène *BRAF* est reconnue comme un facteur prédictif de réponse aux thérapies anti BRAF. Dans le CCR métastatique, il n'a pas été établi de relation entre la présence de mutation sur le gène *BRAF* et la réponse à une thérapeutique ciblée. La présence de mutation est cependant synonyme de mauvais pronostic et d'une survie globale moindre que chez les patients non mutés pour les exons 2, 3 et 4 de *KRAS* et *NRAS*.

Les mutations *KRAS* et *BRAF* sont considérées mutuellement exclusives pour le CCR, la mutation *BRAF V600E* est recherchée en cas d'absence de mutation du gène *KRAS* [Chapman *et al*, 2011].

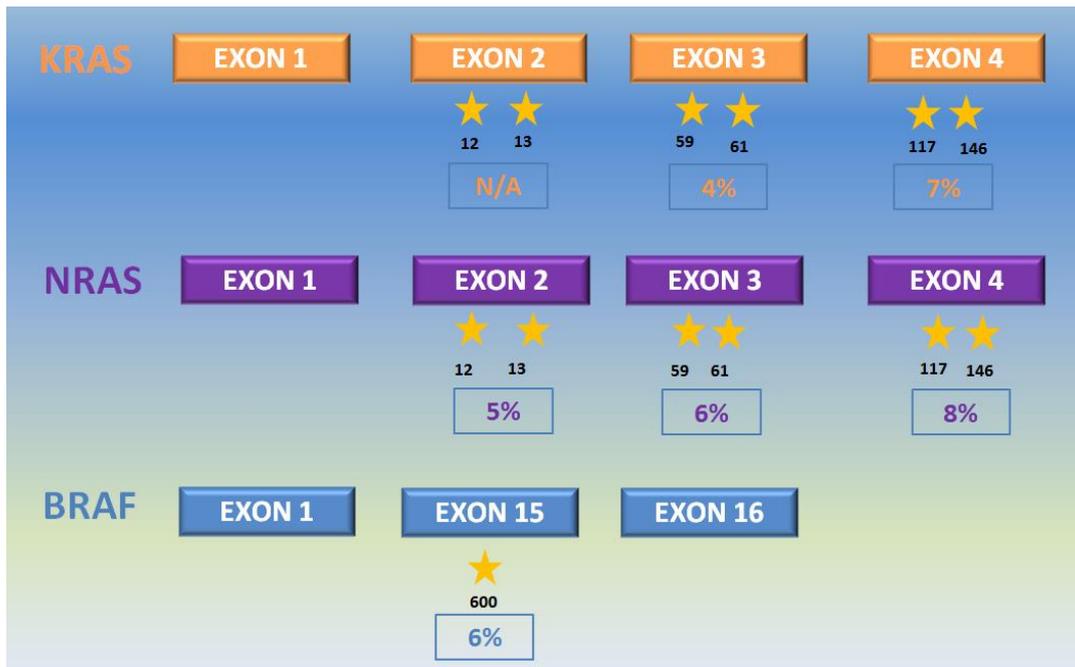


Figure 23 : La localisation des mutations KRAS, NRAS et BRAF. La présence des mutations BRAF est un signe de mauvais pronostic. Les mutations KRAS et BRAF sont considérées mutuellement exclusives.

I.3.3. Mutations du gène *PIK3CA*

Le gène *PIK3CA* se situe sur le chromosome 3 (3q.26.3). Il code la sous-unité catalytique p110 α de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K). Un certain nombre de mutations de *PIK3CA* ont été décrites dans la littérature. Dans une minorité de cas, ces mutations sont présentes sur les exons 1, 2, 4, 5, 7, 12, 13, 10, 18, 21.

Tout comme la présence des mutations V600 de *BRAF*, il semblerait que la présence de mutations de *PIK3CA* soit en faveur d'un mauvais pronostic pour le patient. L'existence d'un lien entre résistance aux anti EGFR et présence de mutations de *PIK3CA* a été souvent débattue. Certaines études concluent en effet en faveur d'une relation entre l'existence de mutation de *PIK3CA*, en particulier sur les exons 9 et 20, et la résistance au traitement par Cetuximab ou Panitumumab [De Rock *et al* 2010]. [Sartore *et al*, 2009]. D'autres études, reposant sur des cohortes de patients plus anciennes et dont les patients ont été traités indifféremment par Cetuximab quel que soit le statut RAS, ne retrouvent pas de relation significative entre l'existence de mutation de *PIK3CA* et la réponse au traitement par anti EGFR [Prenen *et al*, 2009].

I.4.ADN circulants

I.4.1. Histoire et caractéristiques générales des acides nucléiques circulants

Pour améliorer la surveillance des cancers et pour l'évaluation de la réponse à un traitement donné, l'identification des biomarqueurs est devenue très importante [Chau *et al*, 2008].

Malheureusement, très peu de tumeurs solides ont des biomarqueurs valides.

Certains biomarqueurs, comme des protéines circulantes, sont utilisés pour l'identification de certains cancers mais ils ont tous leurs limites et ils ont une très faible sensibilité. En cas de cancer du sein l'antigène tumoral 15-3 (CA 15-3) est utilisé comme biomarqueur. Pour le cancer de la prostate, l'antigène spécifique de la prostate (PSA) est utilisé. Pour le cancer de l'ovaire l'antigène CA 125 est utilisé [Bates *et al*, 1985].

Pour le CCR l'antigène carcinoembryonnaire (ACE) peut être utilisé mais il a une faible sensibilité ; des études ont montré que le niveau d'ACE a été augmenté (> 5 ng/mL) uniquement chez les 4% de patients ayant un CCR de stade I, tandis qu'il a augmenté respectivement de 25%, 44% et 65% chez les patients ayant un CCR de stade II, III et IV [Mawan *et al*, 2016].

Les cellules tumorales circulantes (CTC) ont également été mises en avant comme des biomarqueurs prometteurs. Dans le sang, il existe des milliers de cellules et détecter les CTC nécessite une technique très sensible [Ligthart *et al*, 2011].

En oncologie, la recherche de mutations somatiques à visée théranostique est devenue essentielle pour la prescription de certaines thérapies ciblées. La caractérisation moléculaire des tumeurs permet de prédire l'efficacité des thérapies ciblées. Lors de la croissance tumorale, certaines cellules tumorales meurent et relâchent leur contenu dans la circulation sanguine.

Pour la première fois la présence des acides nucléiques dans le plasma et dans le sérum a été décrite en 1947 par Mandel et Métais. Ils ont montré qu'ils pouvaient être détectés dans le plasma de sujets malades et sains [Mandel *et al*, 1948].

Par des expériences de greffon sur les végétaux, en 1963, l'équipe de Straoum a montré que l'ADN circule entre un greffon et la plante mère [Straoum *et al*, 1966].

C'est en 1977 que Leon et son équipe mettent en évidence de l'ADN circulant dans le sérum de patients atteints de cancer en quantité plus importante que chez des sujets non cancéreux [Leon et al, 1977].

Dans les années 80, sauf dans des cas de maladies rhumatologiques, peu d'attention a été portée sur la recherche de significativité de ces acides nucléiques circulants, mais depuis 1994 l'importance des ADN circulants libres (ADNcf) a été reconnue quand, dans le plasma des patients présentant un cancer, il a été détecté des fragments d'ADNcf comportant les mutations *RAS*.

En 1994, Sorenson et ses collaborateurs démontrent l'origine tumorale de l'ADN circulant chez des patients atteints d'un cancer du pancréas, en mettant en évidence la même mutation de l'oncogène *KRAS* au niveau de l'ADN circulant et de la tumeur [Sorenson et al, 1994].

En 1997, l'équipe de Lo a montré la présence d'acide nucléique circulant d'origine fœtale dans le sang maternel ; grâce à ces travaux, la première méthode de diagnostic de la trisomie 21 a été mise en place [Lo et al, 1997], [Chiu et al 2011].

Les mutations et les translocations identifiées dans les tumeurs peuvent être retrouvées dans l'ADN circulant libre (ADNcf) et signent la présence d'ADN d'origine tumorale (ADNct). L'une des caractéristiques majeures de l'ADNct est sa très grande spécificité car les altérations recherchées dans le sang sont somatiques. Le patient est son propre témoin et la détection des anomalies moléculaires tumorales dans le sang confirme la présence d'ADNct. Depuis, des altérations somatiques spécifiques de l'ADN tumoral circulant ont pu être détectées dans le plasma dans de nombreux cas de cancers.

Les acides nucléiques circulants extracellulaires sont des ADN retrouvés hors des cellules dans le sang, le plasma et la lymphe, mais aussi les acides nucléiques retrouvés dans les fluides non circulants comme les ascites, le lait maternel, les fluides de lavages bronchiques, la bile, et l'urine [Galeazzi et al, 2003].

Ces acides nucléiques peuvent être les ARN, les petits ARN non codants, les micro ARN (miARN) circulants, les ARN messagers circulants, les ADN mitochondriaux circulants et les ADN nucléiques.

Dans ce manuscrit nous nous sommes intéressés prioritairement aux ADNct (ADN tumoraux circulants) libérés dans le sang.

L'ADN circulant extracellulaire peut-être détecté chez les témoins sains et chez les sujets atteints de différentes affections non malignes comme par exemple le lupus érythémateux, la polyarthrite rhumatoïde, l'embolie pulmonaire et l'infarctus du myocarde. Il a été montré également que les différentes procédures thérapeutiques et les traumatismes peuvent entraîner la libération d'ADN libre dans la circulation [Laktionov *et al*, 2004], [Bettegowda *et al*, 2014].

Les ADN circulants sont principalement des molécules d'ADN double brin avec un poids moléculaire qui varie entre des petits fragments à 0.18 kB et les grands fragments allant jusqu'à 21 kB. Ces fragments d'ADN ont des poids moléculaires distinctement plus faibles que les ADN génomiques [Jahr *et al*, 2001].

Les ADN circulants libres sont présents chez les individus sains à des concentrations comprises entre 0 et 100 ng/ml de plasma avec une moyenne de 30 ng/ml de plasma et ils ont essentiellement une origine hématopoïétique [Gormally *et al*, 2007].

Les ADN circulants libres ne circulent pas dans le sang « nus » mais ils forment des complexes nucléoprotéiques ou nucléolipoprotéiques, et de plus chez les personnes saines une autre partie des ADNcf est trouvée absorbée sur la surface des cellules sanguines. Pour permettre la circulation dans le sang des ADNcf, il existe trois catégories de structures avec lesquelles l'ADNcf peut se complexer et qui peuvent également assurer la protection des ADNcf contre l'activité nucléasique et l'environnement extracellulaire. Il s'agit des particules à base de vésicules (vésicules apoptotiques, exosomes), des complexes nucléosomes et des complexes vitrosomes [Florent Moulière, 2012].

La demi-vie des ADN circulants fœtaux dans le sang maternel a été observée et varie entre 4 et 30 min [Lo *et al*, 1999].

L'élimination se fait en 2 étapes : une étape initiale plus rapide et une autre plus lente. Des études chez les animaux ont montré que le foie, les reins et la rate peuvent être responsables de la disparition rapide de l'ADNcf [Korabecna *et al*, 2008] [Tamkovich *et al*, 2006]. En revanche une autre étude a montré que les ADNcf ne sont pas trouvés dans l'urine chez les patients atteints d'un cancer du pancréas [Sorenson *et al*, 2000].

I.4.2. Source des ADN circulants

Chez les personnes saines, l'ADN circulant peut provenir des lymphocytes ou d'autres cellules nucléées, ce qui pourrait expliquer la présence de très faibles concentrations d'ADN circulant chez les sujets sains.

Chez les sujets cancéreux, l'ADN circulant peut également provenir des cellules cancéreuses ou des cellules stromales cancéreuses [Schwarzenbach *et al*, 2011].

Des études ont montré que, dans le plasma, nous pouvons avoir 2 sources différentes d'ADN tumoral circulant, soit par lyse des cellules tumorales par micro-métastases soit par les ADN circulants tumoraux libres. Différentes études ont été réalisées pour comparer les quantités des CTC et des ADNct et ont délivré des conclusions différentes. Par exemple un groupe a conclu que les ADNct sont présents moins souvent que les CTC [Maheswaran *et al*, 2008], mais ce groupe a utilisé une méthode de détection des ADNct ayant une faible sensibilité ; en revanche, un autre groupe a conclu que les ADNct sont présents plus souvent que les CTC, mais celui-ci a utilisé une méthode très sensible pour la détection des ADNct et une méthode relativement moins sensible pour la détection des CTC, donc la question reste encore sous l'attention des chercheurs [Dawson *et al*, 2013] (Figure 24).

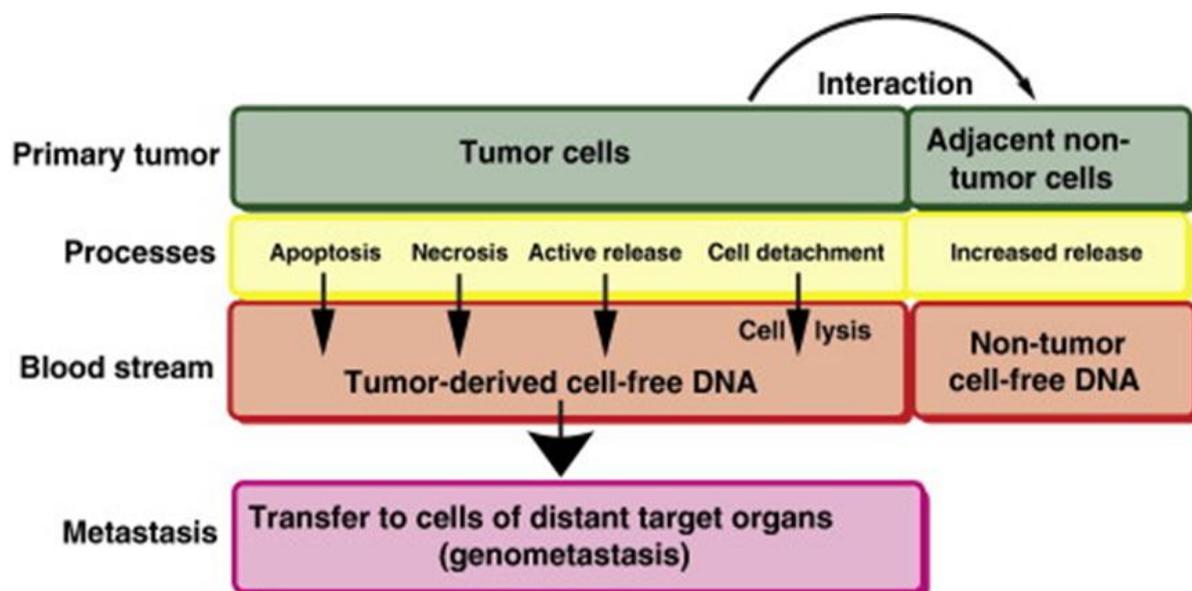


Figure 24 : Les différentes sources des ADN tumoral circulant dans le sang chez les patients avec un cancer et leur importance biologique [Jung *et al*, 2010].

La libération des ADN circulants libres dans le sang se fait par l'apoptose ou par la nécrose des cellules cancéreuses mais également par l'apoptose des cellules normales ; ainsi l'ADNcf est constitué à la fois d'ADN dérivé de la tumeur (ADNct) mais aussi d'ADN non tumoral, provenant de la dégradation de cellules situées dans l'environnement immédiat de la tumeur, secondaire à la croissance tumorale (Figure 24).

Les ADN circulants libres libérés par les cellules en nécrose présentent des tailles élevées et supérieures à 10.000 bp [Wang *et al*, 2003]. En revanche de nombreuses études ont montré que l'apoptose donne des petits fragments d'ADNcf, de 180 bp ou ses multiples, et il a également été montré que les ADNcf ayant une taille de 170 paires de base proviennent des cellules non tumorales [Jiang *et al*, 2015] [Mouliere *et al*, 2015].

Habituellement les cellules apoptotiques ou nécrotiques sont phagocytées par les macrophages et d'autres acteurs cellulaires « cellules *scavenger* ». Les macrophages englobent et digèrent l'ADN et, après l'ingestion, le macrophage libère les ADN circulants libres [Choi *et al*, 2005].

Récemment il a été montré que pour les patients ayant un cancer qui pèse 100 g, cela correspond à $3 \cdot 10^{10}$ cellules cancéreuses, et jusqu'à 3.3% d'ADNct peut rentrer dans le sang chaque jour [Diehl *et al*, 2005].

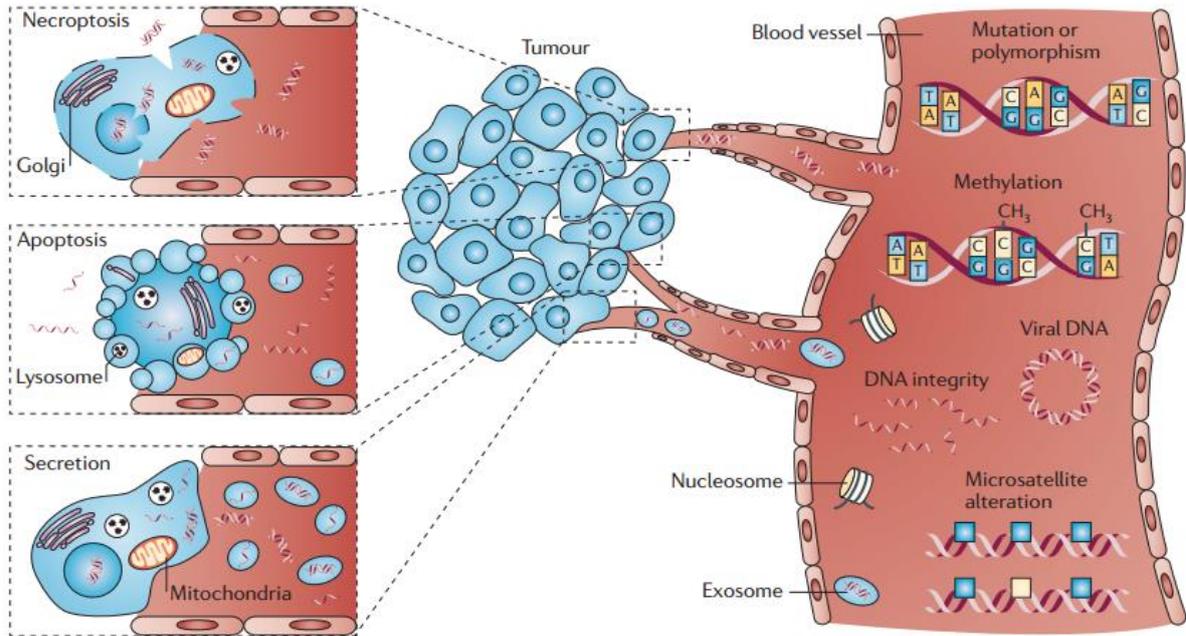


Figure 25 : Les différentes sources d'ADN tumoral circulant dans le sang. Les différents types des mutations, méthylations et altérations de l'ADN peuvent être détectés à partir du plasma grâce aux ADN circulants. Les ADN tumoraux peuvent être présents en différentes quantités et tailles, en simples ou doubles brins et la libération de cet ADN peut se faire par l'apoptose ou par la nécrose [Schwarzenbach et al, 2011].

I.4.3. Quantification des ADN circulants

La quantification de l'ADN circulant provenant d'un cancer représente un grand intérêt. L'ADN circulant tumoral représente une partie minuscule des ADN circulants libres [Diehl et al, 2008].

Mais la seule quantification de la concentration des ADNcf ne peut pas être un marqueur optimal pour la détection du cancer pour plusieurs raisons : tout d'abord, la quantité d'ADN circulant libre peut être augmentée pendant des maladies non cancéreuses comme par exemple pendant des maladies rhumatismales, par ailleurs les ADN circulants tumoraux ont été détectés chez seulement 50% des malades avec un cancer métastatique de la prostate ou la thyroïde et finalement il n'existe pas de marqueurs hautement spécifiques pour les différents types de cancers.

La quantification des ADN circulants tumoraux peut être réalisée par la PCR real time ou par les essais immunologiques.

Chapitre II

Intérêt

II. Intérêt

II.1. ADN circulant chez les sujets sains et dans les pathologies autres que cancer

Les ADN circulants libres se trouvent dans le sang chez les sujets sains en faibles quantités, car la mort cellulaire est efficacement prise en charge par les phagocytes.

L'augmentation d'ADNcf lors d'exercices physiques (syndrome de surentraînement) a été décrite et s'explique par la mort cellulaire massive [Breitbach *et al*, 2012].

La quantité d'ADNcf peut augmenter lors de sepsis, des travaux récents ont montré que l'augmentation de la quantité des ADNcf est liée avec la gravité de maladie. Une autre étude a montré que la quantité d'ADNcf ne varie pas en cas de présence ou d'absence d'insuffisance rénale [Zeerleder *et al*, 2006].

Les ADNcf augmentent en cas de trauma et d'AVC (Accident Vasculaire Cérébral) et également lors des maladies auto-immunes (lupus ou polyarthrite rhumatoïde) [Geiger *et al*, 2006], [Amoura *et al*, 1997].

Les ADNcf sont de plus en plus utilisés dans le diagnostic prénatal d'aneuploïdie chez les femmes à haut risque.

L'équipe de Lo a montré que, chez les femmes enceintes porteuses de fœtus mâle, il est possible d'identifier les séquences fœtales dérivées Y (dans un groupe de 30 femmes enceintes, chez 21 (70%) ces séquences ont été identifiées dans le sérum et chez 24 (80%) dans le plasma) [Lo *et al*, 1999].

Les ADNcf sont utilisés de plus en plus pour le diagnostic de la trisomie 21 (syndrome de Down) chez les femmes à haut risque (âge de la femme, cas dans la famille), ce qui permet d'éviter le diagnostic existant pour cette maladie qui est très invasif. Récemment, dans une étude multicentrique, il a été montré que la détection de la trisomie 21 par les ADNcf a une très haute sensibilité et spécificité en comparaison avec les méthodes de screening standard de détection de la trisomie 21 ; cette étude a montré que la probabilité de faux positif est 100 fois plus basse qu'avec les méthodes standards existantes [Norton *et al*, 2015].

II.2. ADN circulant et cancer

La prise en charge des patients avec un cancer colorectal métastatique passe aujourd'hui par une évaluation clinique, anatomopathologique et biologique à la recherche d'altérations moléculaires pouvant être la cible de nouvelles thérapies. L'identification d'au moins une altération génétique spécifique du tissu tumoral constitue un marqueur tumoral. La mise en évidence d'une mutation somatique dans le sang d'un patient peut alors être évaluée dans le cadre du suivi de la tumeur.

L'utilisation des biomarqueurs pour guider les traitements anti tumoraux et améliorer le pronostic de la maladie a montré un intérêt assez marqué. Mais en pratique cette recherche de biomarqueurs ne peut être réalisée que chez 10 à 30% des patients en rechute (tissu non disponible, nouvelle biopsie non réalisable) ce qui souligne la nécessité d'envisager des alternatives au prélèvement tissulaire pour accéder à l'ADN tumoral circulant. L'utilisation en routine de l'ADN tumoral circulant, biomarqueur sanguin tumoral, non invasif, spécifique, pourrait intervenir dans le dépistage, le diagnostic, la décision thérapeutique et le suivi des patients atteints de cancer.

Différents travaux ont montré que le plasma sanguin contient de petites quantités d'ADN circulant, de l'ordre d'une dizaine de nanogrammes par millilitre, cette concentration pouvant s'élever significativement, jusqu'à 0,5 microgramme par millilitre, chez les patients atteints de cancer. Le dosage radio-immunologique a montré que, chez les patients atteints d'un cancer, la quantité des ADNcf a augmenté significativement.

Les ADN circulants trouvés chez les patients cancéreux ont des caractéristiques quantitatives et qualitatives particulières (Figure 26).

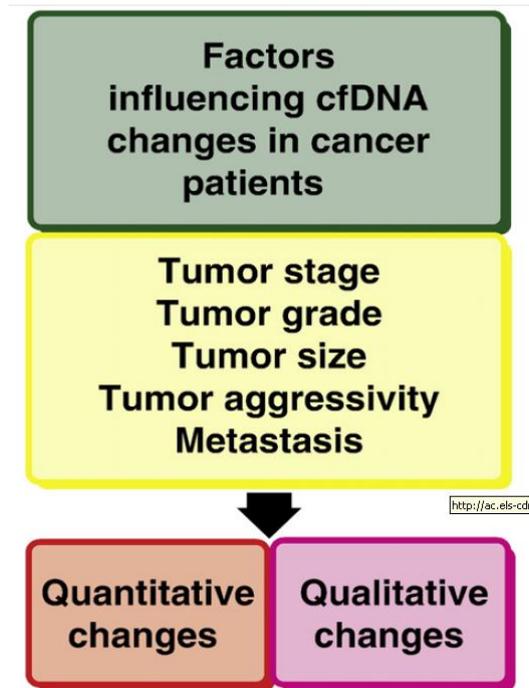


Figure 26 : Facteurs influençant les changements quantitatifs et qualitatifs observés sur les ADN circulants dans le sang de patients cancéreux. Chez les patients cancéreux nous pouvons distinguer les changements quantitatifs et qualitatifs d'ADN circulant selon la taille, le type, le stade de cancer et la présence des métastases [Jung *et al*, 2010].

Il a été montré également que la concentration d'ADNcf est corrélée avec le stade de cancer : par exemple l'ADNcf a été détecté chez 47% de patients avec un cancer de stade I (cancer de différents types) et 82% chez les patients en stade II, III et IV. Ainsi plus le stade est élevé plus la quantité d'ADNcf est importante ; cette augmentation peut être expliquée par un problème de vascularisation : avec l'augmentation de la taille du cancer, les vaisseaux ne peuvent pas suivre l'augmentation de taille ce qui provoque une hypoxie qui active les mécanismes d'apoptose p53-dépendante et p53-indépendante [Holdenrieder *et al*, 1999].

Par ailleurs, le plasma des patients avec des cancers métastatiques comporte beaucoup plus d'ADN circulants que le plasma des malades avec des cancers non métastatiques.

En cas de cancer du poumon non à petite cellules (NSCLC), la quantité d'ADN tumoral circulant est comprise entre 6 et 25 ng/ml et la détermination de cet ADN a 75% de sensibilité et 86% de spécificité pour la détection de NSCLC.

La proportion des ADN circulants varie en fonction du stade et de la taille du cancer. La quantité de ces ADNcf est également influencée par la clearance hépatique, par la filtration rénale et par les autres processus physiologiques de l'organisme. Les acides nucléiques sont éliminés par le foie et les reins et leur demi-vie peut varier entre 15 minutes et plusieurs heures [Didelot A, mémoire, 2017] (Figure 28).

L'analyse de l'ADN circulant tumoral peut également être intéressante pour la détection précoce du cancer et pour son monitoring [Sozzi *et al*, 2001].

En général, la tumeur est un mélange de différents clones de cellules cancéreuses (hétérogénéité génomique et épigénomique des tumeurs), les cellules hématopoïétiques et les cellules stromales. Ainsi lors de la progression d'une tumeur, différents types d'ADN tumoral circulant peuvent être libérés dans la circulation sanguine [Didelot A, mémoire, 2017].

En 1989, il a été montré qu'il est possible de trouver la caractérisation néoplasique du cancer dans le plasma des malades cancéreux [Stroun *et al*, 1989].

En 1994, les travaux ont montré que les mutations des gènes *KRAS* peuvent être trouvées dans le plasma des malades qui ont un carcinome pancréatique. Le concept « biopsie liquide » a été développé [Sorenson *et al*, 1994].

Ce concept consiste à isoler de l'ADN envoyé par la tumeur dans les systèmes fluides (sang, sécrétion, urine....) et de détecter des mutations somatiques (Figure 27).

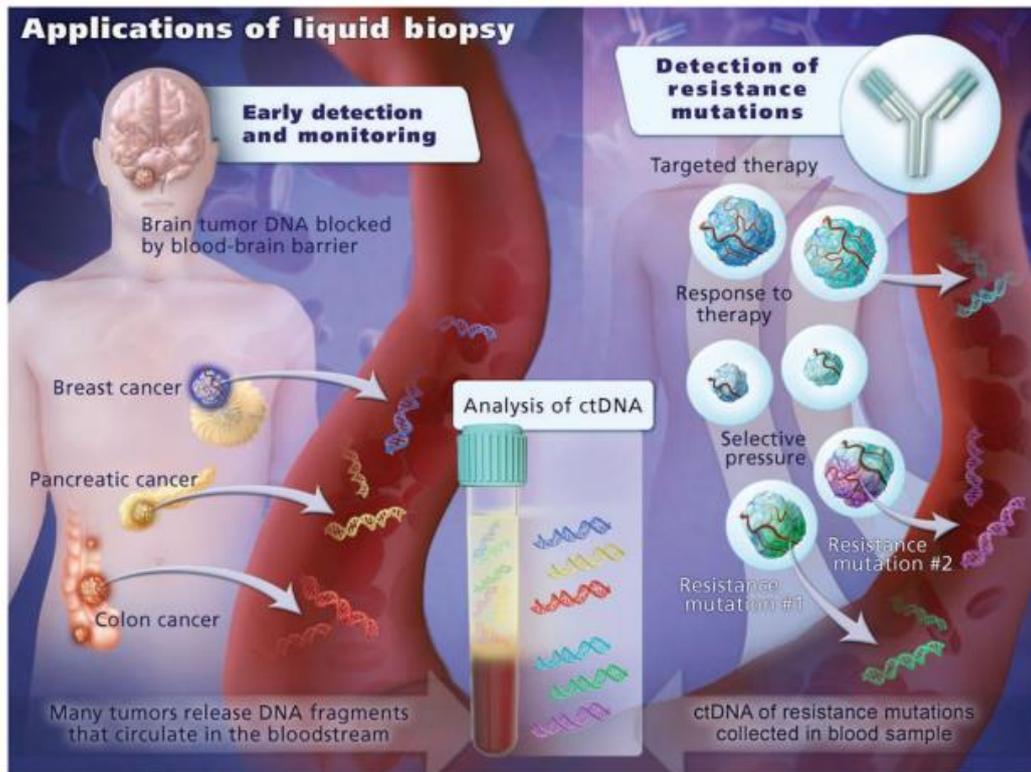


Figure 27 : Application de « biopsie liquide ». Cette biopsie peut être utilisée pour la détection de cancers dans les stades précoces, pour le suivi de traitement, pour la détection de résistance aux traitements [Bettegowda *et al*, 2014].

La « biopsie liquide » apparaît comme le nouveau paradigme pour la caractérisation et le diagnostic moléculaire de la tumeur au cours du traitement et elle a une application clinique prometteuse. Le suivi du changement de quantité d'ADN circulant tumoral peut donner une information importante pour l'évaluation de la tumeur, la détermination des résistances acquises pour une thérapie ciblée et les altérations génétiques et épigénétiques de la tumeur. L'avantage majeur de cette méthode est la possibilité de réaliser l'analyse sanguine à tout moment du traitement et de présenter une invasivité nettement réduite [Schwarzenbach *et al*, 2011].

L'ADN circulant comporte l'ADN codant et non codant qui peuvent être utilisés pour examiner l'instabilité de microsatellites, les mutations, le polymorphisme, la méthylation et le changement de l'intégrité (la taille). Les dernières années ont été marquées par l'intérêt croissant porté sur les ADN non-codants, particulièrement les séquences répétitives comme les séquences *ALU* (avec les courts éléments nucléiques intercalents (SINE) et avec les longs éléments nucléiques intercalents (LINE1)). *ALU* et *LINE1* sont distribués dans le génome et ils sont moins méthyles dans les cellules cancéreuses que dans les cellules normales [Tangkijvanich *et al*, 2007], [Naoyuki *et al*, 2006], [Schulz *et al*, 2006], (Figure 28).

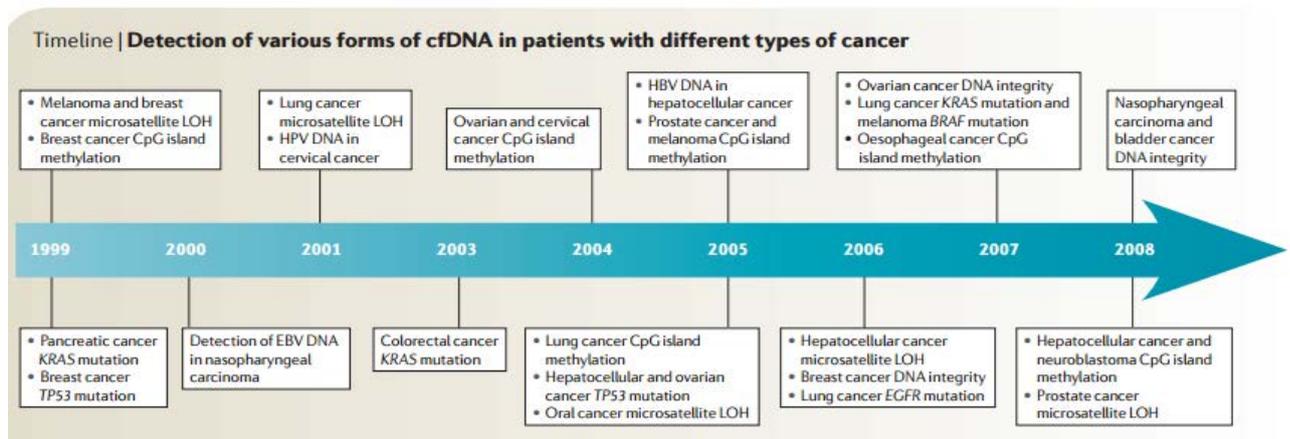


Figure 28 : Détection des différents types d'ADNct chez les patients avec différents types de cancer. Le développement de la détection des différents types d'altérations génétiques et épigénétiques dans les ADNct ont permis d'améliorer la détection de différents types de cancers au cours des 10 dernières années.

Les mutations comme *KRAS*, *NRAS* et *BRAF* représentent des biomarqueurs hautement spécifiques pour la détection de cancers, mais ils peuvent être exprimés également en haute proportion en cas d'autres maladies.

L'analyse des ADNct pour les mutations spécifiques comme pour les gènes de *KRAS* et *TP53* est très intéressante car ces gènes sont mutés très fréquemment pour différents types de cancers et ils participent à leur progression [De Roock *et al*, 2009].

Actuellement il est possible de révéler également les mutations de gènes *BRAF*. L'identification de la présence ou l'absence de ces mutations peut prédire la réponse aux différents traitements. Dans ce contexte, les ADNct sont les seuls moyens pour réaliser un monitoring des patients pendant le traitement, parce que les biopsies répétitives sont non éthiques et invasives.

Le désordre épigénétique peut être évalué par les ADNct et utilisé pour la détection précoce de cancer. L'hyper méthylation des gènes régulant est très fréquente en cas de cancer [Jones *et al*, 2002].

Pour la détection de ces ADN circulants nous avons besoin de techniques permettant leur détection en très faible quantité dans le sang. Ces techniques doivent être simples à mettre en œuvre, reproductibles, peu coûteuses mais surtout très sensibles et spécifiques.

II.3. ADN circulant et CCR métastatique

La cancérogénèse du cancer colorectal est caractérisée par des altérations génétiques des oncogènes et des oncosuppresseurs, notamment les gènes *KRAS* et *TP53*. Ces altérations peuvent devenir des marqueurs fiables pour détecter les CCR par les ADNct dans le plasma [Zlobec *et al*, 2008], [Bazan *et al*, 2006].

D'actives recherches pour trouver les marqueurs prédictifs et pronostics pour les CCR ont montré que la présence de mutations des gènes *KRAS* et *BRAF* est responsable de la résistance au traitement avec les anticorps monoclonaux. La présence des mutations *BRAF* est associée avec un mauvais pronostic et des PFS et OS réduits [Lièvre *et al*, 2006].

Il a récemment été montré que l'hyperméthylation des îlots CpG dans le gène *P16^{INK4A}* est corrélée avec la survie de plusieurs cancers. L'inactivation de ce gène en raison de l'hyperméthylation a été trouvée chez 20 à 50% de patients avec un CCR [Esteller *et al*, 2001].

Les mutations sur le gène *KRAS2* sont les premières altérations génétiques détectées dans les ADNct en cas de CCR. Ces marqueurs présentent un intérêt particulier pour plusieurs raisons. Tout d'abord parce qu'en cas de CCR, il existe une haute probabilité de présence de mutation du gène *KRAS* (50%) : pour environ 80% de patients avec des mutations *KRAS2*, la mutation est située sur le codon 12 ; de manière moins fréquente, elle peut se situer sur le codon 13 et de manière encore moins fréquente sur le codon 61 [Andreyev *et al*, 2001].

L'équipe de Lecompte a montré que la mutation *KRAS2* est détectable dans le plasma chez 25 à 30% de patients avec un CCR et cette mutation est détectable dans le plasma chez les patients en stade très avancé, avec des métastases.

Lors d'un CCR, chez 60 à 70% des patients, le gène codant la protéine P53 est retrouvé muté. L'équipe de Lecompte a trouvé ces mutations dans l'ADNcf chez 15% de malades atteints d'un CCR. Dans le groupe de patients avec un CCR exprimant les mutations de ces gènes, les mêmes mutations ont été trouvées dans les ADNcf présents dans le plasma pour 40% des cas [Lecomte *et al*, 2010].

Actuellement la détection de la présence des mutations des gènes *KRAS*, *NRAS* et *BRAF* est devenue une étape très importante pour la prise en charge des CCR non métastatiques

et métastatiques. La présence de ces mutations est une contre-indication absolue pour le traitement avec les inhibiteurs Anti EGFR.

Des études récentes ont montré qu'il y a une concordance entre la détection des mutations *KRAS*, *BRAF* et *NRAS* dans la tumeur primaire et dans le plasma ; ces résultats ont été confirmés par Lecomte et ses collègues [Lecomte *et al*, 2010] (Tableau 3) (Tableau 4).

L'équipe de Trevisiol s'est intéressée à la détection de la mutation *KRAS2* sur le codon 12 et la détection de cette mutation dans le plasma ; ils ont trouvé que 33% des patients ayant un CCR avaient la mutation sur le gène *KRAS2* codon 12 et chez 36% de patients ayant ces mutations, les mêmes ont été détectées dans le plasma ; chez les 58 autres patients sauvages, les mutations dans le plasma n'ont été trouvées que chez 1 patient. Ils ont également montré l'absence de lien entre la présence de la mutation *KRAS2* et les variables clinicopathologiques comme l'âge, le sexe, le tabagisme et le niveau de CEA et CA 19-9 [Trevisiol *et al*, 2006].

Tableau 3 : Comparaison de détection de mutation des gènes *KRAS* dans le cancer et dans le plasma. L'étude a montré que la comparaison de détection de mutation *KRAS* dans la tumeur et dans le plasma a une sensibilité de 78%, une spécificité de 100%, une valeur positive prédictive de 100% et une valeur négative prédictive de 86% [Trevisiol *et al*, 2006].

	Tumor <i>KRAS</i> mutation	Tumor <i>WTKRAS</i>	Total
Plasma <i>KRAS</i> mutation	32	0	32
Plasma <i>WTKRAS</i>	9	54	63
Total	41	54	95

Tableau 4 : Concordance entre les analyses de tissus tumoraux et les ADNct (n=95) ; l'analyse est faite par test Inplex. L'étude a montré que pour la mutation *KRAS* la sensibilité est de 92%, la spécificité de 98% et la précision de 96% ; pour la mutation *BRAF*, la sensibilité, la spécificité et la précision sont toutes de 100% [Thierry *et al*, 2014].

		Tumor-tissue analysis					
		<i>KRAS</i>	Mutant	WT	Sensitivity	Specificity	Accuracy
cfDNA analysis	Mutant		36	1	92%	98%	96%
	WT		3	55			
	Total		39	56			
		<i>BRAF</i>	Mutant	WT	Sensitivity	Specificity	Accuracy
cfDNA analysis	Mutant		5	0	100%	100%	100%
	WT		0	90			
	Total		5	90			
		All mutations	Mutant	WT	Sensitivity	Specificity	Accuracy
cfDNA analysis	Mutant		41	1	93%	98%	96%
	WT		3	50			
	Total		44	51			

KRAS indicates codon 12 and 13 mutations; *BRAF* indicates V600E mutation.

En dehors de la possibilité de détecter rapidement et facilement les mutations impactant la prise en charge du traitement du cancer, les taux d'ADNct peuvent apparaître également comme des biomarqueurs sanguins pronostiques et dynamiques, permettant de suivre l'évolution de la maladie dans le temps et de potentiellement dépister des récurrences ou progressions précoces ; ils peuvent donc avoir une valeur pronostique et une valeur prédictive [Pietrasz *et al*, 2016].

Valeur pronostique :

Pour montrer la valeur pronostique des ADNct en cas de CCR métastatique, 2 études ont été réalisées (n=100 et n=108). Dans la 1^{ère} étude les patients inclus étaient traités en 3^{ème} ligne par Irinotécan et Cetuximab ; les patients avec un taux d'ADN libre circulant inférieur à la médiane présentaient une survie sans progression et globale significativement meilleure que les autres : respectivement 5,7 *versus* 2,2 [p<0,001] et 12,2 *versus* 4,5 mois [p<0,001]. Dans la 2^{ème} étude les patients inclus étaient traités en 2^{ème} ligne par Irinotecan et l'analyse a été réalisée en fonction du taux d'ADN libre circulant par quartiles ; les survies sans progression et globale des patients du quartile le plus bas étaient respectivement de 5,8 et 18,9 mois, alors qu'elles étaient de 2,5 et 4,5 mois pour les patients du quartile le plus élevé. Ces 2 études ont montré que le taux d'ADN libre circulant avait une valeur pronostique indépendante forte dans les deux études, que ce soit pour la progression ou la survie globale. Le taux d'ADN libre circulant était significativement corrélé au taux d'ADNct [Pietrasz *et al*, 2016], [Spindler *et al*, 2014].

Valeur prédictive :

Le taux d'ADNct apparaît également prédictif de l'efficacité thérapeutique. Dans une étude récente, des mutations tumorales ont été identifiées à partir d'un échantillon tissulaire chez les patients traités en première ligne métastatique. De l'ADNct était retrouvé avant traitement chez 48 des 52 patients pour une concordance de 92,3%. Une réduction significative du taux d'ADNct était observée avant le 2^{ème} cycle et l'importance de cette réduction a été corrélée à la réponse radiologique. L'importance de la diminution du taux d'ADNct observée en 2^{ème} cycle était également associée à une survie sans progression plus longue [Morelli *et al*, 2015].

Chapitre III

Techniques de détection

III. Techniques de détection

L'extraction permettant d'isoler l'ADN tumoral circulant doit idéalement être réalisée dans les heures suivant le prélèvement afin d'éviter toute dégradation. Le choix de la méthode employée est très important.

En 2013, El Messaoudi et ses collaborateurs ont proposé l'utilisation d'un tube contenant de l'EDTA comme anticoagulant lors des prises de sang. Il permet une meilleure conservation de l'ADN, évite une trop grande contamination par les globules blancs et n'inhibe pas la réaction de PCR comme l'héparinate de lithium. La séparation entre le culot globulaire et le plasma doit avoir lieu le plus tôt possible car, dès la deuxième heure suivant le prélèvement, le taux d'ADN circulant augmente. Dans le meilleur des cas, une centrifugation dans les 4 heures est préférable et une conservation à -25°C ou -80°C est conseillée. Les étapes de congélation / décongélation sont à éviter. Du sang laissé 6 heures à température ambiante contient jusqu'à 4 fois moins d'ADN tumoral circulant qu'un prélèvement stocké à 4°C . Il est essentiel de conserver les échantillons au mieux et de les centrifuger au plus vite pour limiter l'effet des DNAses et autres nucléases [Thierry *et al*, 2014].

Le dosage de l'ADN circulant tumoral doit être rapide, exact et facile à réaliser. Les méthodes standards existantes, comme par exemple la Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR), ne montrent pas assez de sensibilité pour détecter les mutations somatiques chez les patients.

De nombreuses techniques ont été appliquées à la détection d'altérations génétiques dans les tumeurs. Le choix de la technique employée repose sur un compromis entre divers critères : le coût, la sensibilité, la disponibilité et l'adéquation avec le type d'échantillon analysé (Figure 29).

Le séquençage par la méthode Sanger a été longtemps le *gold standard*, mais il est de plus en plus écarté en raison de sa faible sensibilité (la détection de l'allèle muté est limitée à 15-20%) et par conséquent on observe un nombre élevé de réponses fausses négatives (Figure 29).

Méthode de détection	Sensibilité	Adaptée à ce type d'échantillon
Séquençage par la méthode Sanger	> 10 %	Tissu tumoral
Pyroséquençage	5-10 %	Tissu tumoral
<i>High resolution melting</i> (HRM)	5 %	Tissu tumoral
Séquençage nouvelle génération	2 %	Tissu tumoral
qPCR en temps réel*	1-10 %	Tissu tumoral
BEAMing, PCR digitale	< 0,01 %	ADN tumoral circulant, variants rares dans le tissu tumoral

Figure 29 : Méthodes utilisées en recherche clinique pour la détection d'altérations génétiques dans les tissus tumoraux. Malgré l'existence de nombreuses méthodes ayant une sensibilité élevée, la sensibilité de certaines méthodes reste insuffisante pour la détection d'ADN tumoral circulant extrait d'effluents biologiques, incluant le plasma [Perez *et al*, 2014].

La détection d'ADN circulant tumoral est un défi, car ces ADN représentent une très faible fraction de l'ADN circulant libre, souvent moins de 0.01%. La recherche d'altérations tumorales dans le plasma nécessite donc la mise en place de techniques moléculaires suffisamment robustes, afin de pouvoir détecter la faible quantité d'ADN, et sensibles afin de pouvoir distinguer l'ADN tumoral circulant parmi tout l'ADN circulant libre.

La quantité de mutations dans l'ADN circulant tumoral, exprimée en proportion des allèles mutants dans l'ADN circulant libre, est très variable, entre 0,5 et 64,1% (10,5% de médiane) et environ 25% des patients avec les mutations présentent une quantité d'ADN circulant tumoral en-dessous de 2%, qui est très bas au regard de la sensibilité des méthodes standards de détection, d'où l'importance de trouver des méthodes plus sensibles. Les récents développements de technologie ont créé des techniques avec une ultra-haute sensibilité comme les méthodes BEAMing, digital PCR ou *refined allele-specific* PCR (Inplex) [Thierry *et al*, 2015].

Aujourd'hui, le manque de sensibilité des techniques utilisées est la principale limite pour détecter l'ADN tumoral circulant dans le plasma. Les méthodes classiques basées sur la PCR en temps réel et la détection des mutations à l'aide de sondes (TaqMan®) ou amorces spécifiques (technologie CastPCR™) ont des seuils de sensibilité de l'ordre de 0,1-1% [Didelot *et al*, 2013]. Ces technologies d'analyse globale sont simples à mettre en œuvre et compatibles sans optimisation technologique pour l'analyse en routine de soin des plasmas. Elles sont testées en première intention. Mais elles présentent des désavantages dans le cas de mélanges complexes. En effet l'ADN issu du plasma est un mélange disproportionné entre de l'ADN issu de cellules normales et cancéreuses. Si l'ADN tumoral circulant ne

représente qu'une infime partie de cet ADN total libre circulant alors il risque d'échapper à l'analyse.

Le développement de techniques comme la PCR digitale (dPCR) (limite de détection théorique de 0,001%-0,05% d'ADN muté) pourrait permettre d'augmenter de façon importante la sensibilité [Taly *et al*, 2013].

Le séquençage haut débit (NGS) quant à lui permet de rechercher des mutations sur des dizaines de locus en parallèle avec une limite de détection acceptable de l'ordre de 0.1%.

III.1. PCR

La PCR est une technique d'amplification in vitro de matériel génétique, développée à la fin des années 80. Actuellement, il existe plusieurs types de PCR :

PCR conventionnelle : le matériel génétique est amplifié dans un thermocycleur (appareil capable de chauffer et refroidir très rapidement) puis le produit d'amplification est déposé sur un gel d'électrophorèse contenant, le plus souvent, du bromure d'éthidium, agent intercalant qui fluoresce sous les UV lorsqu'il est situé entre les bases des acides nucléiques ; après migration des produits d'amplification dans le gel d'agarose, celui-ci est révélé sous les UV. L'inconvénient majeur de cette technique est le risque de contamination des échantillons lors de la manipulation des produits amplifiés.

PCR en temps réel : cette technique tend de plus en plus à remplacer la PCR conventionnelle ; étant plus rapide, elle permet surtout de limiter le risque de contamination entre les échantillons et également de quantifier le génome initialement présent après extraction. La PCR classique présente de nombreuses limitations (amplification préférentielle de petits fragments, production de séquences chimériques, difficulté de détecter des ADN peu représentés) en particulier pour l'amplification de mélanges complexes d'ADN (Figure 31).

La PCR digitale : c'est une approche offrant une plus grande sensibilité et spécificité que la PCR en temps réel. Elle permet la détection d'un allèle cible à partir d'une faible quantité d'un échantillon en utilisant des quantités de réactifs plus faibles que la PCR conventionnelle.

Le concept de PCR digitale a été proposé par Sykes et ses collègues en 1992, par la dilution limitée et par l'analyse statistique en utilisant la loi de Poisson [Sykes *et al*, 1992].

Elle permet la détection d'une copie par population. Cette technique nécessite au préalable l'isolement de molécules d'ADN par répartition de l'échantillon dans de multiples puits selon la méthode de dilution ultime. Une fois chaque molécule d'ADN isolée, une PCR est réalisée dans chaque puits. Chaque puits contient in fine une seule molécule d'ADN, c'est-à-dire que chaque puits contient zéro ou une copie de la séquence d'intérêt.

Chacune des microgouttelettes est analysée individuellement pour détecter la présence ou l'absence d'une mutation spécifique grâce à la sonde de détection choisie à l'avance sur la base d'une connaissance préalable du profil moléculaire de la tumeur ou par choix arbitraire.

Cette technique permet l'identification des portions portant la mutation (positif) et des portions ne portant pas l'anomalie recherchée (négatif). L'étude du rapport négatif/positif permet également de quantifier avec précision le nombre de gouttes contenant un ADN muté ou un ADN sauvage, d'identifier les échantillons mutés (résultat qualitatif) et de quantifier avec précision le rapport allélique en cas de mutation (résultat quantitatif) [Pekin *et al*, 2011], [Zhong *et al*, 2011].

Cette technique a été validée jusqu'à un seuil de détection de mutation de 0,0005% lorsque la quantité d'ADN de départ est suffisante. En effet une limite de détection d'une molécule mutée parmi 100 000 non mutées a été démontrée. Il a été montré qu'il est possible de trouver une mutation *KRAS* dans 200 000 molécules *wild-type*, en utilisant de l'ADN génomique extrait d'une lignée cellulaire de cancer colorectal. Dans le cadre de l'analyse de l'ADN tumoral circulant, ce niveau de sensibilité ne peut pas être atteint car la quantité d'ADN tumoral circulant présente dans le sang est faible (correspondant parfois à une quantité de génome inférieur à 1000). La sensibilité du test en dPCR dépend du nombre de compartiments et de la quantité de molécules analysables, ainsi que du taux de faux-positifs inhérent à la technique utilisée [Heyries *et al*, 2011]. (Figure 30).

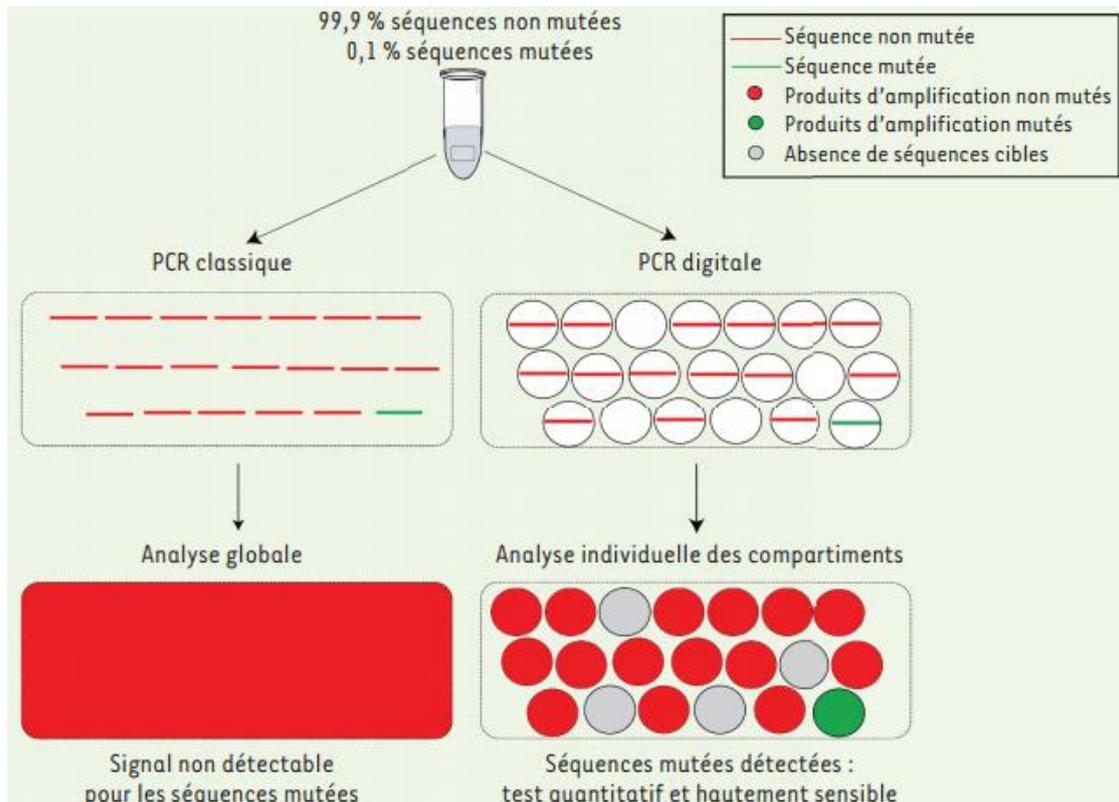


Figure 30 : Comparaison des procédures de la PCR classique et de la PCR digitale. Détection d'une séquence mutée (verte) au sein d'un mélange de séquences non mutées (rouge). La PCR classique amplifie un mélange complexe d'ADN, la détection de la séquence mutée est impossible car noyée dans les séquences non mutées. La PCR digitale amplifie indépendamment toutes les séquences d'ADN présentes dans le mélange, la détection de la séquence mutée est possible car chaque séquence est analysée individuellement [Perez *et al*, 2015].

PCR digitale en émulsion : Elle consiste en l'utilisation de gouttelettes aqueuses dispersées dans de l'huile pour la compartimentation des réactions de PCR, ce qui permet d'envisager un nombre de compartiments théoriquement illimité (qui dépend du volume des gouttelettes et de celui de l'échantillon disponible). La phase aqueuse contient l'ADN cible et le mélange réactionnel nécessaire à la PCR. Cette stratégie, appelée PCR en émulsion (ePCR) permet de réaliser des tests très sensibles et théoriquement moins coûteux que les plateformes utilisant des microchambres.

Les premières procédures d'ePCR créaient des gouttes par agitation mécanique, ce qui entraînait la production de gouttes de tailles très variables. Les gouttelettes générées par ces procédures sont difficilement manipulables.

Afin de mieux contrôler le volume des émulsions, des systèmes microfluidiques ont également été développés pour la réalisation de réactions de dPCR en microgouttelettes. La microfluidique est une technologie fondée sur la manipulation de très faibles quantités de

fluides (de 10^{-9} à 10^{-18} L) dans des microcanaux. En utilisant des écoulements diphasiques (combinaison d'une phase aqueuse et d'une phase d'huile), les systèmes microfluidiques permettent de produire, à haute fréquence, des gouttes micrométriques monodispersées. L'utilisation de tensioactifs stabilise les gouttes en évitant leur coalescence lorsqu'elles entrent en contact. Ces « microréacteurs » peuvent ensuite être manipulés dans les microcanaux grâce à l'implémentation de différents modules de fusion, de division, d'incubation ou encore de tri [Teh *et al*, 2008].

Le choix de la méthode de détection est l'étape suivante et revêt une très grande importance. L'implémentation des techniques de détection utilisées en qPCR (sondes fluorescentes ou molécules s'intercalant dans l'ADN par exemple) permet une détection par fluorescence, ainsi qu'en multiplex, avec une grande sensibilité. Les systèmes microfluidiques fabriqués à partir de matériaux compatibles avec une détection par fluorescence sont particulièrement adaptés à ce type de détection [Baret *et al*, 2010]. (Figure 31).

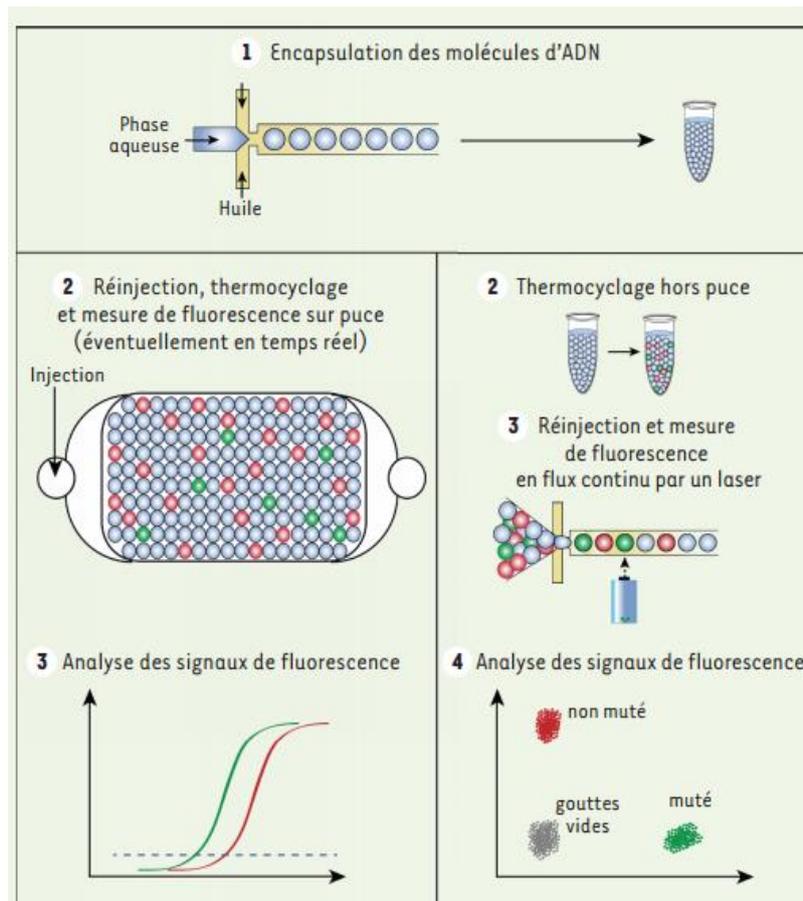


Figure 31 : Analyse par DPCR en microgouttelettes. Cette méthode consiste en l'utilisation de gouttelettes aqueuses dispersées dans de l'huile pour la compartimentation des réactions de PCR, ce qui permet d'envisager un nombre de compartiments théoriquement illimité [Perez *et al*, 2015].

La raindrop digital PCR : c'est une technique de PCR digitale qui permet la détection d'allèles tumoraux peu fréquents. Il s'agit d'une technique sensible, spécifique qui permet une détection quantitative des mutations. L'utilisation de marqueurs de couleurs et d'intensités différentes permet la détection des mutations spécifiques. Cette technique génère 1 à 10 millions de gouttelettes d'une taille de l'ordre du picolitre. Chaque gouttelette contient une molécule d'ADN. Cette technique mesure le ratio des gouttelettes présentant une mutation spécifique aux gouttelettes ne contenant que de l'ADN sauvage.

La réaction PCR est réalisée par gouttelettes. Cette PCR en émulsion utilise les sondes Taqman® spécifiques des gènes mutés et non mutés en présence d'amorces et de l'échantillon d'ADN. Les sondes spécifiques sont conjuguées à un fluorophore qui générera un signal fluorescent.

Cette technique est réalisée en plusieurs étapes : mise en émulsion, recueil de l'émulsion dans un tube PDMS (polydiméthylsiloxane), thermocyclage de l'émulsion pour effectuer de la PCR, puis dépôt sur un dispositif microfluidique.

Lors de l'amplification, les sondes Taqman® sont clivées et le fluorophore est libéré. L'amplification de l'ADN non muté génère un signal rouge fluorescent et celle de l'ADN muté un signal vert fluorescent. L'émulsion est ensuite injectée sur une puce microfluidique et les gouttelettes sont espacées par une solution huileuse, le signal de chaque gouttelette est analysé avec calcul du ratio muté/non muté. Une fluorescence jaune est générée par les gouttelettes contenant de l'ADN à la fois muté et non muté, l'absence de fluorescence correspondra à l'absence de l'ADN.

Parmi les différents avantages de cette méthode, nous pouvons noter sa sensibilité et sa spécificité élevée. Elle peut détecter 1 mutant parmi 250 000 molécules de type sauvage avec une limite inférieure de détection de 1 pour plus de 1 000 000.

Cette technique permet de réaliser simultanément l'analyse de 10 mutations. La réaction est réalisée dans un tube fermé afin d'éviter le risque de contamination [Day *et al*, 2013] [Merlin, 2014, pp153-166] (Annexe 2).

III.2. Le séquençage de nouvelle génération (NGS)

Le séquençage de nouvelle génération (NGS), également connu sous le nom de séquençage à haut débit, est une technologie très différente et complémentaire de la PCR digitale. L'avantage du NGS est de pouvoir analyser simultanément un grand nombre de gènes. Cette technologie permet une analyse moléculaire précise des échantillons d'ADN tumoraux [Schmitt *et al*, 2012] (Figure 32).

C'est une technique à la fois qualitative et quantitative qui permet d'évaluer la présence de mutations et de quantifier la fraction d'allèle mutée. Son système de multiplexage permet d'amplifier simultanément différentes régions du génome prédéfinies par avance, sur plusieurs dizaines d'échantillons. Le développement de l'utilisation de cette technique a permis de mettre sur le marché un large choix de panels commerciaux adaptés au typage des *hotspots* de mutations de différents types de cancer. La possibilité d'utiliser ces panels de gènes optimisés ou de créer des panels « à façon » est un des atouts de cette technologie.

On parle de NGS « ciblé » lorsque le séquençage est effectué sur un nombre défini de gènes. Actuellement, elle garantit une sensibilité de détection de l'ADNct suffisante, mais celle-ci est en théorie plus faible que la dPCR pour 1 mutation donnée. Cependant, des améliorations technologiques et d'analyse pourraient permettre d'augmenter la sensibilité du NGS (Annexe 3 et 4).

Etapes communes aux différentes technologies [Voelkerding *et al*, 2010]

- Fragmentation enzymatique de l'ADN
- Préparation d'une banque d'ADN (library) par ligation d'adaptateurs
- Amplification clonale
- Séquençage générant des signaux (luminescents ou fluorescents)
- Détection des signaux émis et conversion en séquence (Figure 32)

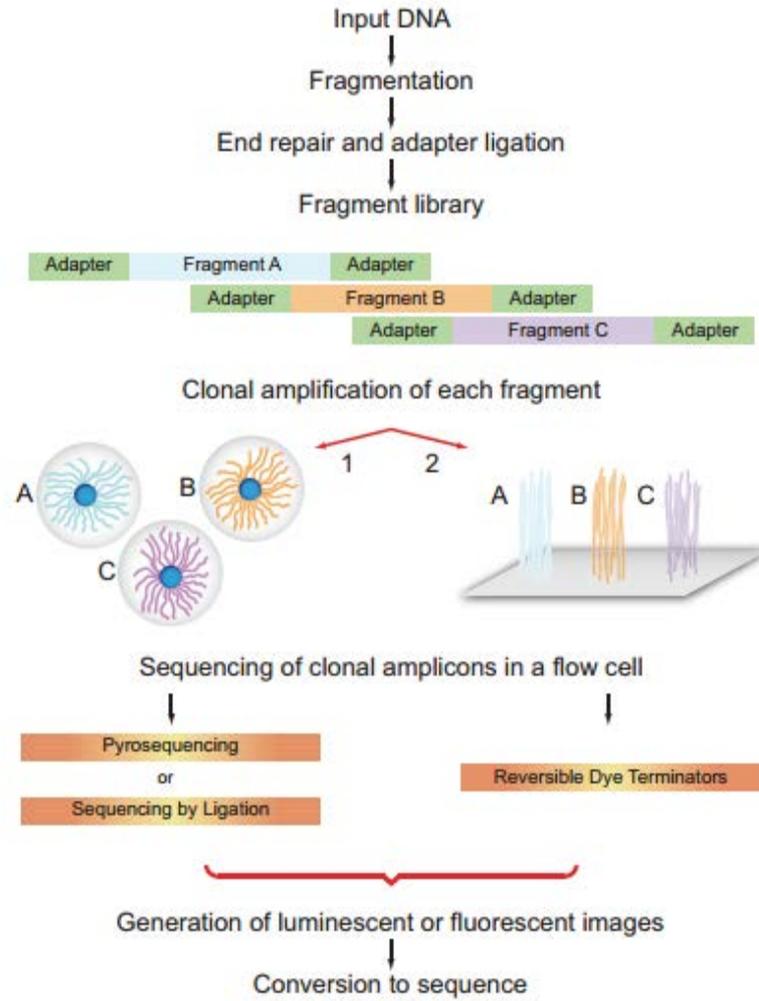


Figure 32 : Principales étapes de génération et d'analyse de données NGS. Les principales étapes de NGS sont : la préparation de banques qui sont créées en utilisant une fragmentation aléatoire de l'ADN suivie de la liaison avec des petites séquences spécifiques puis l'amplification (la banque est amplifiée grâce à des méthodes d'amplification clonale et de PCR) et finalement le séquençage (l'ADN est séquençé en utilisant différentes approches en fonction de la technologie utilisée) [Voelkerding *et al*, 2010].

III.3. BEAMing

Le BEAMing a été décrit par Dressman en 2003. Le but de cette technique consiste en la conversion de chaque molécule d'ADN en bille magnétique, chacune de ces billes magnétiques contenant des milliers de copies de séquences d'intérêt de la molécule d'ADN originale. La consistance des perles correspond exactement aux molécules d'ADN de départ. La variation dans les molécules d'ADN originales peut alors être simplement évaluée en comptant les particules marquées par fluorescence par cytométrie de flux [Dressman *et al*, 2003].

Les fragments d'ADN sont placés en émulsion sur des billes magnétiques, permettant la création de billes monoclonales. Après amplification par PCR, les émulsions sont cassées et les billes triées à l'aide d'un aimant. Un oligonucléotide fluorescent de séquence spécifique est ensuite incubé avec les billes. Les fluorescences sont comptabilisées par cryométrie en flux.

Cette approche s'appelle BEAMing sur la base de quatre de ses principaux composants (*beads, emulsion, amplification, and magnetics*). Des millions de molécules d'ADN individuelles peuvent être évaluées de cette manière avec des équipements de laboratoire standard. Par ailleurs, le BEAMing peut être utilisé pour l'identification et la quantification de mutations rares, ainsi que pour étudier les variations dans les séquences de gènes ou les transcriptions dans des populations ou des tissus spécifiques.

Taniguchi et ses collègues ont appliqué la technologie BEAMing pour la première fois pour l'analyse des mutations EGFR dans le cancer du poumon non à petites cellules. Les mutations activatrices de l'EGFR se retrouvent dans les 10% des patients caucasiens et dans les 50% des patients asiatiques avec un cancer du poumon non à petites cellules. Ces mutations sont détectées plus souvent chez les femmes, les non-fumeurs et dans les adénocarcinomes [Kazuya *et al*, 2011].

La technique de BEAMing se réalise en 6 principales étapes :

1. Couplage des oligonucléotides aux billes magnétiques

Pour la réalisation de cette étape les billes de streptavidine sont utilisées, car le couplage des oligonucléotides biotinylés est simple avec ce type de billes. Ce sont des billes magnétiques de $1.05 \pm 0.1 \mu\text{m}$ de diamètre qui sont liées par des liaisons covalentes avec le streptavidin (Annexe 5).

Il a été montré que les oligonucléotides présentant uniquement un seul groupe 5'-biotine ne sont pas stables et se dissocient des billes pendant le thermocyclage, tandis que les oligonucléotides marqués avec deux groupes de biotine à leur extrémité 5' (les deux groupes sont séparés par un linker de six atomes de carbone) restent indissociables pendant le thermocyclage.

Il a été constaté que les oligonucléotides longs (41 pb) fonctionnent mieux pour l'amorçage que les oligonucléotides plus courts (20 bases), ce qui peut s'expliquer par l'encombrement stérique (*steric hydrance*) de la surface des billes magnétiques. Il a été montré également que les oligonucléotides modifiés (amino-, sulfhydryle- ou carboxyle-) peuvent également être utilisés en les couplant de manière covalente à des billes magnétiques [Dressman *et al*, 2003].

2. Préparation de microémulsion

Pour la préparation de microémulsion, plusieurs méthodes ont été décrites. Cette microémulsion contient 2 phases :

- La phase huileuse qui peut contenir plusieurs huiles en différentes quantités (comme par exemple 4,5% Span80, 0,40% Tween80, 0,05% Triton X-100 et les huiles minérales). Il est conseillé de préparer fraîchement la phase huileuse chaque jour.
- La phase aqueuse peut également contenir différents composants (comme par exemple 67mM (pH 8,8) HCl, 6,6mM NH_4SO_4 , 6,7mM MgCl_2 , 10mM 2-mercaptoéthanol, 1mM d'ATP, 1mM d'CTP, 1mM d'GTP, 1mM d'TTP, 0,05 μM d'amorce directe, 25 μM d'amorce inverse, diverses quantités d'ADN *etc*).

La microémulsion est préparée habituellement en rajoutant goutte à goutte la phase aqueuse dans la phase huileuse. Après l'addition de la phase aqueuse, le mélange doit être agité pendant 30 minutes [Dressman *et al*, 2003].

3. Amplification d'ADN par PCR

La réaction de PCR sur les billes couplées par des oligonucléotides biotynilés s'est montrée inefficace par rapport à la réaction de PCR sur les mêmes oligonucléotides lorsqu'ils sont libres en solution. Pour cette raison, il a été proposé de rajouter à la solution une petite quantité d'amorce directe non biotynylée identique en séquence à l'oligonucléotide biotynylé couplé aux billes magnétiques. Cela facilite les premiers cycles d'amplification dans cette réaction. En l'absence des amorces supplémentaires libres, aucune amplification détectable n'est produite sur les billes magnétiques, en revanche la quantité excessive de ces amorces peut générer l'effet inverse, c'est-à-dire l'absence de l'amplification sur les billes magnétiques en raison de la concurrence avec les amorces en solution. La quantité ajoutée de ces amorces doit être donc bien contrôlée.

4. Rupture d'émulsion

Plusieurs façons de briser les émulsions eau-dans-huile ont été décrites y compris l'extraction avec des matières organiques. Il a été constaté également que le simple rajout de détergents non ioniques peut produire des séparations de phase sans aucune modification détectable des billes ou des molécules d'ADN liées à elles.

5. Différenciation des séquences d'ADN liées aux billes magnétiques

Pour distinguer les allèles capturés sur les billes magnétiques, la plupart des procédés sont basés sur l'utilisation de la fluorescence. Ces méthodes comprennent une extension de nucléotide unique, un amorçage spécifique d'un allèle ou une hybridation.

6. Cytométrie de flux

Les résultats optimums en cytométrie de flux dépendent des signaux fluorescents des billes magnétiques. Pour améliorer la fluorescence, il est possible de réaliser une hybridation des sondes avec des réactifs secondaires. Par exemple, des anticorps marqués par l'Alexa 488 peuvent être utilisés pour améliorer les signaux émanant des sondes oligonucléotidiques couplées à la fluorescéine. De même, la streptavidine marquée par la R-phycoérythrine peut être utilisée pour générer un signal provenant de sondes oligonucléotidiques marquées par la biotine.

Les cytomètres de flux équipés de deux ou trois lasers et des filtres appropriés ont la capacité de distinguer les locus multi-alléliques et d'effectuer une analyse multiplex de plusieurs gènes simultanément. La dernière génération de cytomètres de flux peut également analyser plus de 70 000 événements par seconde. En plus de la puissance

analytique de la cytométrie de flux, les agents de tri de cellules activés par fluorescence peuvent séparer des populations spécifiques de billes pour une analyse plus approfondie [Dressman *et al*, 2003], [Tawfik *et al*, 1998] (Figure 33).

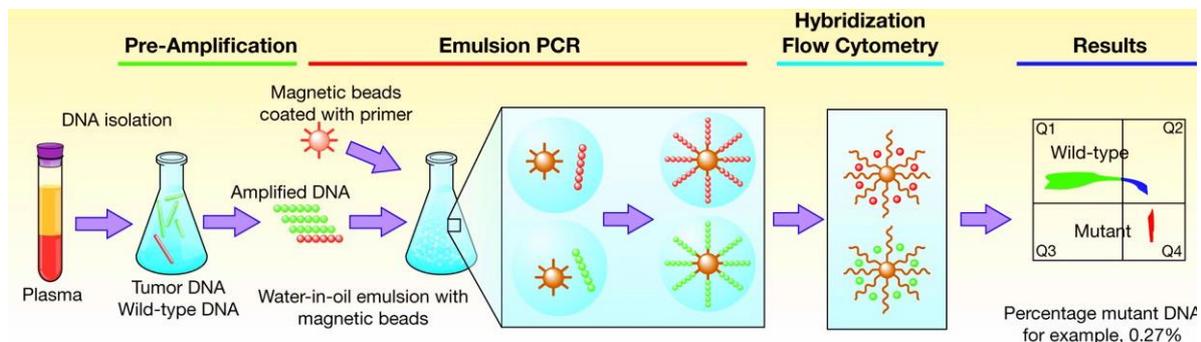
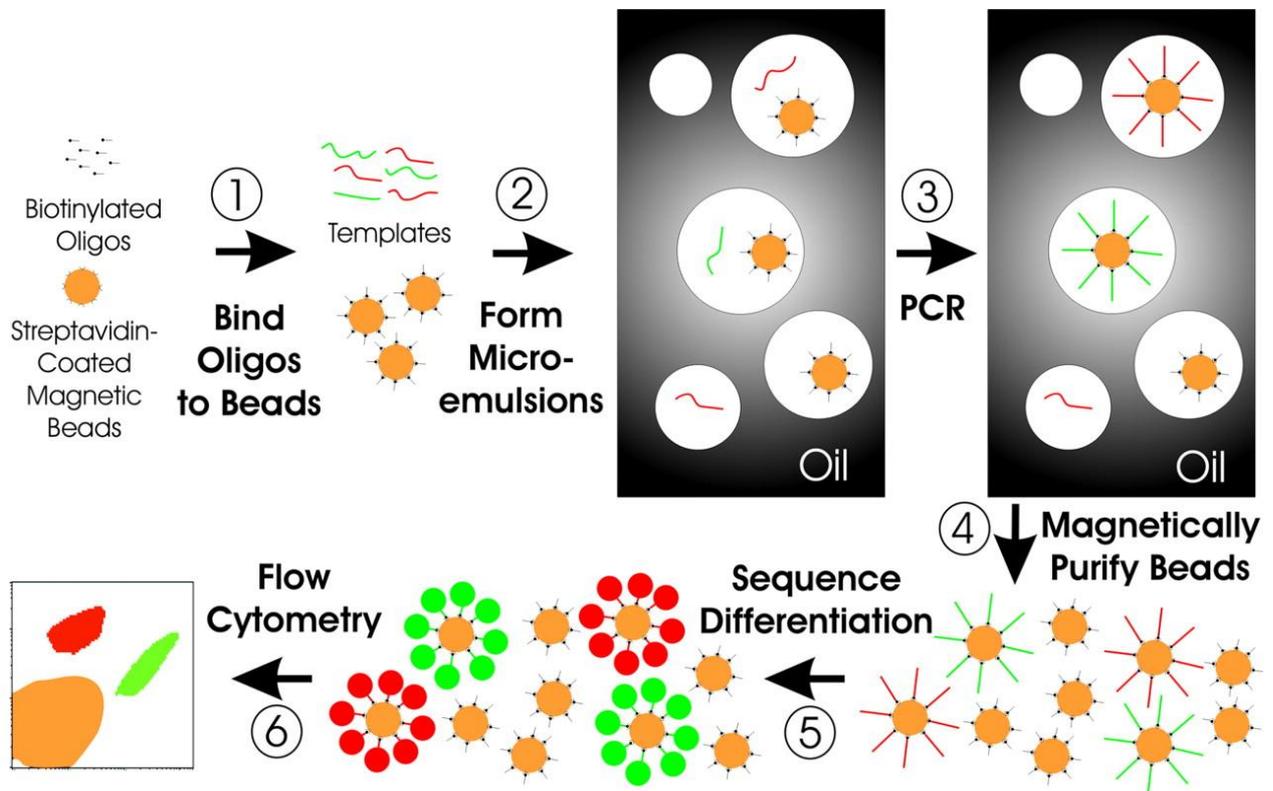


Figure 33 : Les principales étapes de la méthode BEAMing. BEAMing est réalisé par 6 étapes principales. Etape 1 : les billes magnétiques qui sont liées par les liaisons covalentes avec la streptavidine sont liées avec les oligonucléotides biotinylés. Etape 2 : préparation d'une microémulsion comportant 2 phases (aqueuse et huileuse), les billes magnétiques se trouvent dans le compartiment aqueux. Etape 3 : réalisation de la réaction PCR pour l'amplification de l'ADN fixé sur les billes. Etape 4 : rupture d'émulsion ; l'émulsion est cassée et les billes magnétiques sont récupérées en utilisant un aimant. Etape 5 : différenciation des séquences d'ADN liées aux billes magnétiques ; après la dénaturation, les billes magnétiques sont couplées avec les séquences fluorescentes. Etape 6 : cryométrie de flux : quantification des billes liées avec les amorces mutées [Dressman *et al*, 2003].

La méthode BEAMing est une méthode fiable et sensible pour évaluer les variations de gènes du génome. Au niveau de la faisabilité le BEAMing est assez facile à réaliser en tenant compte des instruments nécessaires : il ne demande aucune instrumentation autre qu'un agitateur magnétique, les instruments pour la réalisation de la réaction PCR et un cytomètre de flux, tous largement disponibles dans les laboratoires.

L'avantage important du BEAMing est la possibilité d'augmenter la sensibilité en augmentant simplement le nombre de billes analysées afin de répondre aux spécifications de l'expérience. Cette méthode offre non seulement la possibilité de mettre en évidence la présence des mutations spécifiques mais aussi de quantifier ces mutations rares. Cette quantification devient également possible car, grâce à cette méthode, on n'ignore pas les molécules de type sauvage dans le cadre de l'analyse.

Un autre avantage de cette méthode consiste en la possibilité de réutilisation ou recyclage des billes magnétiques, qui peuvent être facilement purifiées et utilisées pour une expérimentation ultérieure, réduisant nettement le coût de la méthode. Une telle récupération est difficile avec des techniques numériques qui comptent les molécules déposées sur des lames de microscope. Enfin l'approche BEAMing, en principe, est totalement automatisée et ne demande pas une grande équipe ou la présence permanente de professionnels [Dressman *et al*, 2003].

Chapitre IV

Conclusion

IV. Conclusion

Le cancer est la principale cause de la morbidité et de la mortalité dans le monde. Le cancer colorectal est l'un des cancers les plus fréquents et les plus mortels en France et dans le monde ; près de la moitié des patients décèdent dans les 5 ans suivant le diagnostic.

Pendant les dix dernières années, des avancées significatives dans les domaines de la chirurgie, chimiothérapie et de la thérapie ciblée ont nettement diminué la mortalité de ce cancer mais, malgré tout, le CCR reste un problème important pour la santé publique. Malgré des avancées dans le domaine de la thérapie ciblée, la survie à 5 ans continue à stagner aux alentours de 10%, donc le pronostic reste assez sombre.

Le CCR n'a pas de signes cliniques accentués et, pour cette raison, ces cancers ne sont pas souvent diagnostiqués dans les stades précoces mais déjà en stade bien avancés ; dans certains cas, ce sont les métastases qui révèlent les CCR primitifs. Le CCR est un cancer très agressif et il donne très rapidement des métastases, notamment des métastases hépatiques.

La survie face au CCR dépend fortement du stade de découverte de la maladie : plus le cancer est découvert dans les stades précoces, plus la prise en charge est complète et plus la survie est longue. Le dépistage de masse de la population générale est une nécessité pour tenter de diagnostiquer les cancers dans les stades plus précoces.

La classification clinique en stade histologique et la classification moléculaire selon les formes d'instabilité du génome (l'instabilité des microsatellites (MSI), l'instabilité chromosomique (CIN) et l'hyperméthylation des promoteurs (CIMP)) ne suffisent pas à définir des entités homogènes du point de vue moléculaire et à prédire de manière efficace la récurrence. L'hétérogénéité de tumeur (hétérogénéité inter- et intra-tumorale) et l'évolution clonale sont des challenges significatifs pour désigner les stratégies efficaces de traitement. Pour améliorer la prise en charge des patients, il apparaît indispensable de mieux appréhender la diversité de la maladie afin de trouver des marqueurs pronostiques et prédictifs efficaces.

La prise en charge du cancer colorectal métastatique a évolué grâce à l'apparition des thérapies ciblées, notamment celles anti EGFR. La survie globale et la survie sans progression ont été améliorées. Dans la prise en charge de ce cancer, le statut RAS est très important (la présence des mutations sur les gènes *KRAS*, *NRAS* et *BRAF*).

Le Cetuximab et le Panitumumab sont deux anticorps monoclonaux anti EGFR qui sont prescrits si le patient ne présente pas les mutations et le Bevacizumab, qui est un anticorps anti VEGF, peut être prescrit que la tumeur soit mutée ou pas.

En oncologie, la recherche de mutations somatiques à visée théranostique est devenue la règle pour la prescription de certaines thérapeutiques ciblées. Dans le cas du CCR, la recherche des mutations *RAS* est devenue essentielle pour la décision thérapeutique, le statut *RAS* sauvage étant nécessaire pour assurer l'efficacité des anti EGFR (Cetuximab, Panitumumab). C'est le seul facteur prédictif de réponse au traitement par anticorps monoclonaux anti EGFR validé.

Actuellement, toute recherche de mutation somatique nécessite au préalable la réalisation d'un prélèvement tumoral (pièce opératoire, biopsie, cytoponction), au sein de plateformes de biologie moléculaire labellisées par l'INCA et nécessite la présence de nombreux intervenants (cliniciens, pathologistes, biologistes moléculaires). Le matériel prélevé est ensuite fixé, conformément aux recommandations de l'INCA, dans du formol tamponné ou plus rarement dans d'autres fixateurs comme l'AFA (acide acétique, formol et alcool) puis inclus en paraffine.

Cette organisation est relativement complexe et peut occasionner un délai dans l'obtention d'un résultat. Deux enquêtes nationales (en 2011 puis en 2014) ont montré que le délai pour obtenir un statut *RAS* chez un patient avec un cancer colorectal métastatique était d'environ 3 semaines en France. Outre les problèmes liés au pré-analytique (temps d'ischémie chaude et froide, fixation des tissus ...), la réalisation de biopsie présente parfois certains inconvénients, notamment les contraintes liées à l'accessibilité du site à biopsier mais surtout relatives à l'invasivité et à la douleur que peut provoquer ce geste médical. De plus, il est considéré comme non éthique et, pour le moment, non scientifiquement fondé de pratiquer une seconde biopsie chez un patient pour lequel un premier résultat contributif aurait été obtenu. Ces différents points justifient l'intérêt de développer des techniques innovantes pouvant apporter les mêmes informations que les techniques de biopsies conventionnelles, moins invasives, moins douloureuses et moins contraignantes pour le patient.

Plusieurs types de biomarqueurs moléculaires peuvent être analysés à partir d'un prélèvement de sang périphérique. Parmi eux l'ADN tumoral circulant (ADNct) est l'un des plus prometteurs. Les cellules cancéreuses libèrent des fragments d'ADN tumoral dans la circulation sanguine, après l'apoptose ou nécrose, ou il pourrait provenir de la lyse des cellules tumorales circulantes ou de micrométastases. L'ADN portant les mutations

spécifiques de la tumeur peut se retrouver fortement dilué dans l'ADN libre circulant total du malade, provenant de cellules saines de l'organisme. D'où l'importance de trouver des méthodes de détection très sensibles, qui seront capables de mettre en évidence la quantité minimale d'ADN tumoral circulant.

Il a été montré que la quantité d'ADN tumoral circulant augmente dans les stades avancés de cancer et en cas de métastase. L'augmentation du nombre de copies d'ADNct apparaît donc comme un facteur de mauvais pronostic et posséderait un impact sur la survie globale. L'évaluation régulière du nombre de copies permettrait donc un monitoring de l'efficacité des thérapies anticancéreuses, qu'elles soient standards ou ciblées.

La détection et la recherche de mutation sur l'ADNct seraient également essentielles dans l'évaluation de la réponse au traitement et permettraient l'adaptation des traitements en fonction de l'apparition des résistances. Le suivi moléculaire par biopsie liquide permettrait le suivi de l'évolution des variations génomiques du cancer en réponse aux thérapies.

La mise en place de ce type d'analyse en routine serait donc une avancée majeure dans le domaine du diagnostic moléculaire en oncologie et représente un défi, au moment où se développent les traitements personnalisés. Il pourrait également intervenir dans le dépistage, le diagnostic, la décision thérapeutique et le suivi des patients atteints d'un cancer. Cependant, ceci nécessite au préalable une standardisation des techniques afin d'assurer des résultats de qualité et des comparaisons entre laboratoires (procédures sur les conditions de collecte de sang, le traitement du plasma ou du sérum, le stockage, la conservation, les conditions cliniques, les variations diurnes, etc).

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses techniques de diagnostic moléculaire ultrasensible destinées à l'analyse de l'ADNct ont fait leur apparition sur le marché, parmi lesquelles nous pouvons citer le digital PCR, le droplet digital PCR (BioRad ®) (sensibilité : 0.001-0.05%) le BEAMing (Sysmex ®) (sensibilité : 0.001%), la raindrop digital PCR (RainDance ®) et la méthode Intplex (INSERM). Toutes ces technologies permettent la détection et l'énumération de variations génétiques à partir d'ADNct.

L'ADN tumoral circulant comporte différents types d'anomalie moléculaire (mutations ponctuelles, délétion, insertion, translocation, amplification, méthylation) présentes dans la tumeur primitive ou dans les métastases. Il est donc important d'avoir une technique capable de mettre en évidence l'ensemble de ces anomalies en une seule fois.

La dPCR, malgré sa sensibilité élevée, a ses limites car elle ne permet d'analyser qu'un nombre restreint de mutations à la fois. Le séquençage de nouvelle génération (NGS) permet d'étudier plusieurs centaines d'anomalies moléculaires simultanément, mais la sensibilité de la détection du NGS (de l'ordre de 2%) est moins élevée que celle de la dPCR.

Le BEAMing (Bead, Emulsion, Amplification and Magnetics) (Sysmex®) est une technique réalisée en six étapes. Après extraction, purification et pré-amplification, l'émulsion d'eau en huile est préparée. L'émulsion contient les séquences des oligonucléotides biotinylés, les différents *primers* et les billes magnétiques entourées par la striptavidine. Il s'agit d'une technique de PCR sur molécules d'ADN fixées sur billes magnétiques sur lesquelles se trouvent les amorces spécifiques du gène d'intérêt. La PCR est réalisée sur les billes en émulsion. Des sondes fluorescentes marquées spécifiques de la séquence sauvage ou de la mutation sont ensuite ajoutées et s'hybrident à l'ADN amplifié. La dernière étape de la technique consiste en la détection de la fluorescence par cytométrie de flux et donc en la qualification du nombre de billes contenant de l'ADN muté. Le seuil de détection d'ADN circulant est de 0.01%. La sensibilité de cette méthode est d'environ 1 allèle muté pour 10 000 non mutés et elle est limitée par le niveau des erreurs des polymérases (*limited by error rate of polymerase*).

Il a été montré que, chez les patients présentant un cancer colorectal en stade IV, les mutations somatiques sont détectées par la méthode BEAMing avec 100% de sensibilité.

La méthode BEAMing présente plusieurs avantages par rapport aux méthodes existantes. Tout d'abord il s'agit d'une méthode sensible et très fiable qui permet de mettre en évidence des changements génétiques des cellules cancéreuses et la présence ou l'absence de différentes mutations. La réalisation de BEAMing ne demande pas la présence de laboratoires très élaborés, cette méthode ayant une faisabilité assez importante, qui diminue nettement les frais de mise en œuvre et enfin c'est une méthode assez automatisée ne demandant pas la présence d'une grande équipe. Le fait de pouvoir réutiliser ou recycler des billes magnétiques diminue également le coût de cette méthode. Le BEAMing est donc à la fois efficace, sensible et présente un coût médico-économique intéressant.

L'utilisation de la méthode BEAMing dans la routine de diagnostic et dans l'organisation de traitement des différents cancers peut être très intéressante pour plusieurs raisons.

Tout d'abord, il est possible d'intégrer cette méthode dans la routine du dépistage de cancer chez les personnes saines, en évaluant la quantité des ADN circulants dans le sang avec une simple prise de sang. Chez les personnes malades cette méthode peut être utilisée pour suivre l'avancement du cancer, la présence des métastases ou pour évaluer l'efficacité des traitements réalisés en mettant en évidence l'apparition de résistances aux différents traitements, tout ceci en diminuant la souffrance des patients et en rendant la surveillance plus accessible et économiquement plus intéressante.

BIBLIOGRAPHIE

Abdalla E, Adam R, Bilchik A, Jaeck D, Vauthey J, Mahvi D. Improving resectability of hepatic colorectal metastases: expert consensus statement. *Ann Surg Oncol*. **2006**; 13(10):1271-80

Amoura Z, Piette JC, Chabre H, Cacoub P, Papo T, Wechsler B, et al. Circulating plasma levels of nucleosomes in patients with systemic lupus erythematosus: correlation with serum antinucleosome antibody titers and absence of clear association with disease activity. *Arthritis Rheum*. **1997**; 40(12):2217-25

Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the « RASCAL II » study. *Br J Cancer*. **2001**; 85(5):692-6

Association canadienne du cancer colorectal. Comprendre le cancer colorectal [en ligne]. Disponible sur: <http://www.colorectal-cancer.ca/fr/les-faits-detour/cancer-quoi> (page consulté le 15/06/2017)

Baret J-C, Beck Y, Billas-Massobrio I, Moras D, Griffiths AD. Quantitative Cell-Based Reporter Gene Assays Using Droplet-Based Microfluidics. *Chem Biol*. **2010**; 17(5):528-36

Bates SE, Longo DL. Tumor markers: value and limitations in the management of cancer patients. *Cancer Treat Rev*. **1985**; 12(3):163-207

Bazan V, Bruno L, Augello C, Agnese V, Calò V, Corsale S, Et Al. Molecular Detection Of TP53, Ki-Ras And P16ink4a Promoter Methylation In Plasma Of Patients With Colorectal Cancer And Its Association With Prognosis. Results Of A 3-Year GOIM (Gruppo Oncologico Dell'italia Meridionale) Prospective Study. *Ann Oncol*. **2006**; 17(Suppl 7):Vii84-Vii90

Benoist Chibaudel CT. Therapeutic Strategy In Unresectable Metastatic Colorectal Cancer: An Updated Review. *Ther Adv Med Oncol*. **2015**; 7(3)

Bennouna J, Sastre J, Arnold D, Österlund P, Greil R, Van Cutsem E, et al. Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (ML18147): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. **2013**; 14(1):29-37

Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. **2014**; 6(224):224ra24

Bibeau F, Frugier H, Denouel A, Sabourin J-C, Boissiere-Michot F. [Technical considerations for KRAS testing in colorectal cancer. The pathologist's point of view. *Bull Cancer*. **2009**; 96 Suppl:S15-22

Boyle P, Langman JS. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ*. **2000**; 321(7264):805-8

Breitbach S, Tug S, Simon P. Circulating cell-free DNA: an up-coming molecular marker in exercise physiology. *Sports Med.* **2012**; 42(7):565-86

Chantal Dreyer, Éric Raymond, Sandrine Faivre. PI3K / AKT / Mtor Signalling Pathway. *Cancéro Dig.* **2009**; 187- 9

Centers for Disease Control and Prevention & National Cancer Institute; Cancer Statistics Working Group. United States Cancer Statistics: 1999–2005 Incidence and Mortality Web-based Report. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services. [en ligne]. Disponible sur : www.cdc.gov/uscs, (page consulté le 21/07/2017)

Chaix M, Vincent J, Lorgis V, Ghiringhelli F. FOLFIRINOX bevacizumab is a promising therapy for chemorefractory metastatic colorectal cancer. *Oncology.* **2014**; 87(3):148-58

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* **2011**; 364(26):2507-16

Chau CH, Rixe O, McLeod H, Figg WD. Validation of analytic methods for biomarkers used in drug development. *Clin Cancer Res.* **2008**; 14(19):5967-76

Chiu RWK, Akolekar R, Zheng YWL, Leung TY, Sun H, Chan KCA, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ.* **2011**; 342:c7401

Choi J-J, Reich CF, Pisetsky DS. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology.* **2005**; 115(1):55-62

Day E, Dear PH, McCaughan F. Digital PCR strategies in the development and analysis of molecular biomarkers for personalized medicine. *Methods.* **2013**; 59(1):101-7

Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, et al. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med.* **2013**; 368(13):1199-209

De Roock W, Biesmans B, De Schutter J, Tejpar S. Clinical biomarkers in oncology: focus on colorectal cancer. *Mol Diagn Ther.* **2009**; 13(2):103-14

De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* **2010**; 11(8):753-62

Didelot A, Kotsopoulos SK, Lupo A, Pekin D, Li X, Atochin I, et al. Multiplex picoliter-droplet digital PCR for quantitative assessment of DNA integrity in clinical samples. *Clin Chem.* **2013**; 59(5):815-23

Didelot A. Place de l'ADN tumoral circulant dans la prise en charge des patients atteints d'une tumeur pulmonaire : impact pronostique et suivi dynamique de l'évolution des altérations génétiques au cours du traitement. Mémoire de l'École Pratique des Hautes Études. 2017, 124p

Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2005**; 102(45):16368-73

Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. **2008**; 14(9):985-90

Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. **2017**; 17(2):79-92

Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2003**;100(15):8817-22

Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Final results from PRIME: randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. **2014**; 25(7):1346-55

Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res*. **2002**; 62(9):2447-54

Esteller M, González S, Risques RA, Marcuello E, Mangues R, Germà JR, Et Al. K-Ras And P16 Aberrations Confer Poor Prognosis In Human Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. **2001**; 19(2):299-304

Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol*. **2007**; 25(13):1670-6

Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta*. **2007**; 1775(1):181-232

Florent Moulière. Etude de la structure et de l'origine des ADN circulants : application à la mise au point d'un test de détection des mutations KRAS et BRAF dans le cancer colorectal. Université de Montpellier 2. Thèse de Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé. 2012. 123p

Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer. World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research: A Global Perspective. Washington, DC: *American Institute for Cancer Research*; **2007**

Institut National Du Cancer .Les cancers en France en 2014 - L'essentiel des faits et chiffres [en ligne]. Disponible sur : <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Les-cancers-en-France-en-2014-L-essentiel-des-faits-et-chiffres> (page consulté le 15/07/2017)

Galeazzi M, Morozzi G, Piccini M, Chen J, Bellisai F, Fineschi S, et al. Dosage and characterization of circulating DNA: present usage and possible applications in systemic autoimmune disorders. *Autoimmun Rev.* **2003**; 2(1):50-5

Geiger S, Holdenrieder S, Stieber P, Hamann GF, Bruening R, Ma J, Et Al. Nucleosomes In Serum Of Patients With Early Cerebral Stroke. *Cerebrovasc Dis.* **2006**; 21(1-2):32-7

Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol.* **2007**; 25(12):1539-44

Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutat Res.* **2007**; 635(2-3):105-17

Grothey A, Sargent D. Overall survival of patients with advanced colorectal cancer correlates with availability of fluorouracil, irinotecan, and oxaliplatin regardless of whether doublet or single-agent therapy is used first line. *J Clin Oncol.* **2005**; 23(36):9441-2

Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* **2013**; 381(9863):303-12.

Harlé A. Marqueurs de réponse aux thérapies ciblées et personnalisation thérapeutique dans les cancers colorectaux métastatiques. These de doctorat de l'université de Lorraine. Université de Lorraine. 2014. 152p.

Heyries KA, Tropini C, Vaninsberghe M, Doolin C, Petriv OI, Singhal A, Et Al. Megapixel Digital PCR. *Nat Meth.* **2011**; 8(8):649-51

Holdenrieder S, Stieber P, Förg T, Köhl M, Schulz L, Busch M, Et Al. Apoptosis In Serum Of Patients With Solid Tumours. *Anticancer Res.* **1999**; 19(4A):2721-4

Huang M-Y, Liu H-C, Yen L-C, Chang J-Y, Huang J-J, Wang J-Y, et al. Detection of activated KRAS from cancer patient peripheral blood using a weighted enzymatic chip array. *Journal of Translational Medicine.* **2014**; 12:147

Institut National Du Cancer .Les cancers en France en 2014 - L'essentiel des faits et chiffres [en ligne]. Disponible sur : <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Les-cancers-en-France-en-2014-L-essentiel-des-faits-et-chiffres> (page consulté le 15/07/2017)

Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*. **1993**; 363(6429):558-61

Jackson-Thompson J, Ahmed F, German RR, Lai S-M, Friedman C. Descriptive epidemiology of colorectal cancer in the United States, 1998-2001. *Cancer*. **2006**; 107(5 Suppl):1103-11

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*. **2001**; 61(4):1659-65

Jatin R, Kenneth H. Molecular Mechanisms of Colorectal Carcinogenesis. In Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer; **2013**. p. 25-65

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *Cancer Journal for Clinicians*; **2011**; 61(2):69-90

Jiang P, Chan CWM, Chan KCA, Cheng SH, Wong J, Wong VW-S, Et Al. Lengthening And Shortening Of Plasma DNA In Hepatocellular Carcinoma Patients. *Proc Natl Acad Sci USA*.. **2015**;112(11):E1317- 25

Jones PA, Baylin SB. The Fundamental Role Of Epigenetic Events In Cancer. *Nat Rev Genet*. **2002**; 3(6):415-28

Jong A, Morreau H, Nagengast F, Mathus-Vliegen E, Kleibeuker J, Griffioen G, et al. Prevalence of adenomas among young individuals at average risk for colorectal cancer. *Am J Gastroenterol*. **2005**; 100(1):139-43

Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-Free DNA In The Blood As A Solid Tumor Biomarker--A Critical Appraisal Of The Literature. *Clin Chim Acta*. **2010**; 411(21-22):1611-24

Kazuya Taniguchi, Junji Uchida, Kazumi Nishino, Toru Kumagai, Takako Okuyama, Jiro Okami, Masahiko Higashiyama. Quantitative Detection Of EGFR Mutations In Circulating Tumor DNA Derived From Lung Adenocarcinomas. *Clinical Cancer* . 11-1712. **2011**

Keyse SM. Dual-Specificity MAP Kinase Phosphatases (Mkps) And Cancer. *Cancer Metastasis Rev*. **2008**; 27(2):253-61

Laktionov PP, Tamkovich SN, Rykova EY, Bryzgunova OE, Starikov AV, Kuznetsova NP, et al. Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. **2004**; 23(6-7):879-83

Lecomte T, Ceze N, Dorval E, Laurent-Puig P. Circulating free tumor DNA and colorectal cancer. *Gastroenterol Clin Biol*. **2010**; 34(12):662-81

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

Lièvre A, Laurent-Puig. La voie de signalisation RAS/MAPK RAS/MAPK signaling pathway. *Cancéro dig Vol 2 N°1*- **2010** - 38-42

Lièvre A, Blons H, Laurent-Puig P. Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer. *Oncogene*. **2010**; 29(21):3033-43

Lièvre A, Bachet J-B, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile J-F, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res*. **2006**; 66(8):3992-5

Lièvre A, Bachet J-B, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. **2008**; 26(3):374-9

Ligthart ST, Coumans FAW, Attard G, Cassidy AM, de Bono JS, Terstappen LWMM. Unbiased and automated identification of a circulating tumour cell definition that associates with overall survival. *PLoS ONE*. **2011**; 6(11):e27419

Linardou H, Dahabreh IJ, Bafaloukos D, Kosmidis P, Murray S. Somatic EGFR mutations and efficacy of tyrosine kinase inhibitors in NSCLC. *Nat Rev Clin Oncol*. **2009**;6(6):352-66

Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. **1997**; 350(9076):485-7

Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet*. **1999**; 64(1):218-24

Macaluso M, Russo G, Cinti C, Bazan V, Gebbia N, Russo A. Ras family genes: An interesting link between cell cycle and cancer. *J Cell Physiol*. **2002**; 192(2):125-30

Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura CV, et al. Detection of Mutations in EGFR in Circulating Lung-Cancer Cells. *N Engl J Med*. **2008**; 359(4):366-77

Mandel P, Metais P. Les Acides Nucléiques Du Plasma Sanguin Chez L'homme. *C R Seances Soc Biol Fil.* **1948**; 142(3-4):241-3

Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med.* **2009**; 361(25):2449-60

Marwan G. Fakhri et al. CEA Monitoring in Colorectal Cancer | *Cancer Network*, **2016**.

Mendelsohn J, Baselga J. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin Oncol.* **2006**; 33(4):369-85

Merlin J-L. Biomarqueurs Moléculaires en Oncologie. *Springer*, **2014**. 175p

Morelli MP, Overman MJ, Dasari A, Kazmi SMA, Mazard T, Vilar E, et al. Characterizing the patterns of clonal selection in circulating tumor DNA from patients with colorectal cancer refractory to anti-EGFR treatment. *Ann Oncol.* **2015**; 26(4):731-6

Mouliere F, El Messaoudi S, Gongora C, Guedj A-S, Robert B, Del Rio M, et al. Circulating Cell-Free DNA from Colorectal Cancer Patients May Reveal High KRAS or BRAF Mutation Load. *Transl Oncol.* **2013**; 6(3):319-28

Mouliere F, Rosenfeld N. Circulating Tumor-Derived DNA Is Shorter Than Somatic DNA In Plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2015**; 112(11):3178- 9

Naoyuki Umetani AEG. Prediction of Breast Tumor Progression by Integrity of Free Circulating DNA in Serum. *J Clin Oncol.* **2006**; 24(26):4270-6

Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclow NCW, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med.* **2014**; 20(5):548-54

Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, Laurent LC, Ranzini AC, Brar H, et al. Cell-free DNA Analysis for Noninvasive Examination of Trisomy. *N Engl J Med.* **2015**; 372(17):1589-97

Nutting CM. Cancer. Principles & practice of oncology (6th edn). Ed. by V T DeVita Jr, S Hellman and S A Rosenberg, pp. lxxii+3235, 2001 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA), \$235.00 ISBN 0-781-72229-2. *BJR.* **2002**; 75(894):567-567

Perez-Toralla K, Pekin D, Bartolo J-F, Garlan F, Nizard P, Laurent-Puig P, Et Al. PCR Digitale En Micro-Compartiments - I. Détection Sensible De Séquences D'acides Nucléiques Rares. *Med Sci (Paris).* **2015**;31(1):84-92

Pekin D, Skhiri Y, Baret J-C, Le Corre D, Mazutis L, Salem CB, Et Al. Quantitative And Sensitive Detection Of Rare Mutations Using Droplet-Based Microfluidics. *Lab Chip.* **2011**;11(13):2156-66

Peters DL, Pretorius PJ. Origin, Translocation And Destination Of Extracellular Occurring DNA--A New Paradigm In Genetic Behaviour. *Clin Chim Acta*. **2011**; 412(11-12):806-11

Petrelli F, Borgonovo K, Cabiddu M, Ghilardi M, Lonati V, Maspero F, et al. FOLFIRI-bevacizumab as first-line chemotherapy in 3500 patients with advanced colorectal cancer: a pooled analysis of 29 published trials. *Clin Colorectal Cancer*. **2013** ; 12(3):145-51

Pillaire MJ, Villani G, Hoffmann JS, Mazard AM, Defais M. Characterization and localization of cis-diamminedichloro-platinum(II) adducts on a purified oligonucleotide containing the codons 12 and 13 of H-ras proto-oncogene. *Nucleic Acids Res*. **1992**; 20(24):6473-9

Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. **2010**; 138(6):2059-72

Pietrasz D, Pécuchet N, Fabre E, Blons H, Chevalier L, Taly V, Et Al. Quel Avenir Pour L'adn Tumoral Circulant ? État Des Lieux Et Perspectives Dans Les Cancers Colorectaux, Pulmonaires Non A Petites Cellules Et Pancréatiques. *Bull Cancer*. **2016**; 103(1):55-65

Prenen H, De Schutter J, Jacobs B, De Roock W, Biesmans B, Claes B, Et Al. PIK3CA Mutations Are Not A Major Determinant Of Resistance To The Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Cetuximab In Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. **2009**; 15(9):3184-8

Pöschl G, Seitz H. Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol*. **2004**; 39(3):155-65

Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, Et Al. PIK3CA Mutations In Colorectal Cancer Are Associated With Clinical Resistance To EGFR-Targeted Monoclonal Antibodies. *Cancer Res*. **2009**; 69(5):1851-7

Schmitt MW, Kennedy SR, Salk JJ, Fox EJ, Hiatt JB, Loeb LA. Detection Of Ultra-Rare Mutations By Next-Generation Sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2012**; 109(36):14508-13

Schulz WA, Steinhoff C, Florl AR. Methylation Of Endogenous Human Retroelements In Health And Disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. **2006**; 310:211-50

Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-Free Nucleic Acids As Biomarkers In Cancer Patients. *Nat Rev Cancer*. **2011**; 11(6):426-37

Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *Cancer Journal for Clinicians*. **2015**; 65(1):5-29

Singh AB, Harris RC. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal*. **2005**; 17(10):1183-93

Shia J. Immunohistochemistry versus Microsatellite Instability Testing For Screening Colorectal Cancer Patients at Risk For Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome. *J Mol Diagn.* **2008**; 10(4):293-300

Sobin L, Compton CC. TNM seventh edition: what's new, what's changed: communication from the International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer.* **2010**; 116(22):5336-9

Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble Normal And Mutated DNA Sequences From Single-Copy Genes In Human Blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **1994**; 3(1):67-71

Sorenson GD. Detection Of Mutated KRAS2 Sequences As Tumor Markers In Plasma/Serum Of Patients With Gastrointestinal Cancer. *Clin Cancer Res.* **2000**; 6(6):2129-37

Souglakos J, Androulakis N, Syrigos K, Polyzos A, Ziras N, Athanasiadis A, et al. FOLFOXIRI (folinic acid, 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan) vs FOLFIRI (folinic acid, 5-fluorouracil and irinotecan) as first-line treatment in metastatic colorectal cancer (MCC): a multicentre randomised phase III trial from the Hellenic Oncology Research Group (HORG). *Br J Cancer.* **2006**; 94(6):798-805

Sozzi G, Conte D, Mariani L, Vullo SL, Roz L, Lombardo C, Et Al. Analysis Of Circulating Tumor DNA In Plasma At Diagnosis And During Follow-Up Of Lung Cancer Patients. *Cancer Res.* **2001**; 61(12):4675-8

Spindler K-LG, Appelt AL, Pallisgaard N, Andersen RF, Brandslund I, Jakobsen A. Cell-Free DNA In Healthy Individuals, Noncancerous Disease And Strong Prognostic Value In Colorectal Cancer. *Int J Cancer.* **2014**.;135(12):2984-91

Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic Characteristics Of The DNA Found In The Plasma Of Cancer Patients. *Oncology.* **1989**; 46(5):318-22

Stroun M, Anker P, Ledoux L. [Fate Of DNA Of Bacterial Origin After Its Migration Into Plants]. *Arch Int Physiol Biochim.* **1966**; 74(5):935-7

Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ, Hughes E, Condon J, Morley AA. Quantitation Of Targets For PCR By Use Of Limiting Dilution. *Biotechniques.* **1992**;13(3):444-9

Tawfik DS, Griffiths AD. Man-Made Cell-Like Compartments For Molecular Evolution. *Nat Biotech.* **1998**;16(7):652-6

Teh S-Y, Lin R, Hung L-H, Lee AP. Droplet Microfluidics. *Lab Chip.* **2008**; 8(2):198-220

Taly V, Pekin D, Benhaim L, Kotsopoulos SK, Le Corre D, Li X, Et Al. Multiplex Picodroplet Digital PCR To Detect KRAS Mutations In Circulating DNA From The Plasma Of Colorectal Cancer Patients. *Clin Chem.* **2013**; 59(12):1722-31

Tamkovich SN, Cherepanova AV, Kolesnikova EV, Rykova EY, Pyshnyi DV, Vlassov VV, Et Al. Circulating DNA And Dnase Activity In Human Blood. *Ann N Y Acad Sci.* **2006**; 1075:191-6

Tangkijvanich P, Hourpai N, Rattanatanyong P, Wisedopas N, Mahachai V, Mutirangura A. Serum LINE-1 Hypomethylation As A Potential Prognostic Marker For Hepatocellular Carcinoma. *Clinica Chimica Acta.* **2007**; 379(1–2):127-33.

Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, Et Al. Clinical Validation Of The Detection Of KRAS And BRAF Mutations From Circulating Tumor DNA. *Nat Med.* **2014**; 20(4):430-5

Therkildsen C, Bergmann TK, Henrichsen-Schnack T, Ladelund S, Nilbert M. The Predictive Value Of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA And PTEN For Anti-EGFR Treatment In Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review And Meta-Analysis. *Acta Oncol.* **2014**; 53(7):852-64

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science.* **1993**; 260(5109):816-9

Trevisiol C, Di Fabio F, Nascimbeni R, Peloso L, Salbe C, Ferruzzi E, Et Al. Prognostic Value Of Circulating KRAS2 Gene Mutations In Colorectal Cancer With Distant Metastases. *Int J Biol Markers.* **2006**; 21(4):223-8

Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. FOLFIRI Followed by FOLFOX6 or the Reverse Sequence in Advanced Colorectal Cancer: A Randomized GERCOR Study. *J Clin Oncol.* **2004**; 22(2):229-37

Vanhoefler U, Harstrick A, Achterrath W, Cao S, Seeber S, Rustum YM. Irinotecan in the treatment of colorectal cancer: clinical overview. *J Clin Oncol.* **2001**; 19(5):1501-18

Van Cutsem E, Köhne C-H, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien C-R, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* **2009**; 360(14):1408-17

Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, Prenen H, Prausová J, Macarulla T, Et Al. Addition Of Aflibercept To Fluorouracil, Leucovorin, And Irinotecan Improves Survival In A Phase III Randomized Trial In Patients With Metastatic Colorectal Cancer Previously Treated With An Oxaliplatin-Based Regimen. *J Clin Oncol.* **2012**;30(28):3499-506

Van Cutsem E, Köhne C-H, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, Et Al. Cetuximab Plus Irinotecan, Fluorouracil, And Leucovorin As First-Line Treatment For Metastatic Colorectal Cancer: Voelkerding KV, Dames S, Durtschi JD. Next Generation Sequencing For Clinical Diagnostics-Principles And Application To Targeted Resequencing For Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Mol Diagn.* **2010**; 12(5):539-51

Updated Analysis Of Overall Survival According To Tumor KRAS And BRAF Mutation Status. *J Clin Oncol.* **2011**; 29(15):2011- 9

Wang J-Y, Hsieh J-S, Lu C-Y, Yu F-J, Wu J-Y, Chen F-M, Et Al. The Differentially Mutational Spectra Of The APC, K-Ras, And P53 Genes In Sporadic Colorectal Cancers From Taiwanese Patients. *Hepato gastroenterology.* **2007**; 54(80):2259-65

Wang BG, Huang H-Y, Chen Y-C, Bristow RE, Kassaei K, Cheng C-C, Et Al. Increased Plasma DNA Integrity In Cancer Patients. *Cancer Res.* **2003**; 63(14):3966- 8

Willett WC. Diet And Cancer: An Evolving Picture. *JAMA.* **2005**; 293(2):233- 4

Wilmink AB. Overview Of The Epidemiology Of Colorectal Cancer. *Dis Colon Rectum.* **1997**; 40(4):483-93

World Health Organization. Estimation Cancer Incidence Mortality And Prevalence Worldwide 2012 [En Ligne]. Disponible Sur : [Http://Globocan.iarc.fr/Pages/Fact_Sheets_Cancer.aspx](http://Globocan.iarc.fr/Pages/Fact_Sheets_Cancer.aspx) (Page Consulté Le 21/07/2017)

World Health Organization. Colorectum Cancer Statistics In India, Globocan 2012. [En Ligne]. Disponible Sur : [Http://Globocan.iarc.fr/la/Asia/Atlas.html](http://Globocan.iarc.fr/la/Asia/Atlas.html), (Page Consulté Le 21/07/2017)

Yen L-C, Yeh Y-S, Chen C-W, Wang H-M, Tsai H-L, Lu C-Y, Et Al. Detection Of KRAS Oncogene In Peripheral Blood As A Predictor Of The Response To Cetuximab Plus Chemotherapy In Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* **2009**; 15(13):4508- 13

Korabecna M, Opatrna S, Wirth J, Rulcova K, Eiselt J, Sefrna F, Et Al. Cell-Free Plasma DNA During Peritoneal Dialysis And Hemodialysis And In Patients With Chronic Kidney Disease. *Ann N Y Acad Sci.* **2008**; 1137:296- 301

Zhong Q, Bhattacharya S, Kotsopoulos S, Olson J, Taly V, Griffiths AD, Et Al. Multiplex Digital PCR: Breaking The One Target Per Color Barrier Of Quantitative PCR. *Lab Chip.* **2011**; 11(13):2167- 74.

Zeerleder S. The Struggle To Detect Circulating DNA. *Crit Care.* **2006**; 10(3):142

Zisman A, Nickolov A, Brand R, Gorchow A, Roy H. Associations Between The Age At Diagnosis And Location Of Colorectal Cancer And The Use Of Alcohol And Tobacco: Implications For Screening. *Arch Intern Med.* **2006**; 166(6):629-34

Zlobec I, Lugli A. Prognostic And Predictive Factors In Colorectal Cancer. *J Clin Pathol.* **2008**;
61(5):561- 9

ANNEXES

Annexe 1 : La classification du CCR

Annexe 2 : Représentation schématique de différents types de PCR digitale

Annexe 3 : Les étapes principales de NGS

Annexe 4 : Comparaison des technologies de séquençage à haut débit

Annexe 5 : Les principales caractéristiques des billes magnétiques streptovidine

Annexe 1 : La classification du CCR

Stade 0 (carcinome in situ)

TNM	Description
Tis N0 M0	Les cellules cancéreuses sont seulement dans le revêtement interne, ou muqueuse, du côlon ou du rectum. On pourrait les observer dans l'épithélium, ou elles pourraient avoir envahi la couche de tissu conjonctif de la muqueuse appelée lamina propria. Les cellules cancéreuses ne se sont pas développées au-delà de la couche musculaire de la muqueuse appelée musculaire muqueuse

Stade I

TNM	Description
T1 ou T2 N0 M0	La tumeur a envahi la couche de tissu conjonctif qui entoure la muqueuse, soit la sous-muqueuse, ou la couche musculaire externe épaisse du côlon ou du rectum appelée musculature

Stade II

Stades	TNM	Description
IIA	T3 N0 M0	La tumeur a envahi la sous-séreuse (une des couches externes entre la musculature et la séreuse) du côlon ou du rectum, ou elle a envahi les tissus mous entourant le côlon et le rectum, soit les tissus péricolorectaux
IIB	T4a N0 M0	La tumeur a traversé la membrane qui recouvre et soutient le côlon et le rectum, soit le péritoine viscéral
IIC	T4b N0 M0	La tumeur a traversé la paroi du côlon ou du rectum jusque dans d'autres organes ou structures

Stade IIIA

TNM	Description
T1 ou T2 N1 M0	<p>La tumeur a envahi la couche de tissu conjonctif qui entoure la muqueuse, soit la sous-muqueuse, ou la couche musculaire externe épaisse du côlon ou du rectum appelée musculéuse</p> <p>Il y a des métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux. On a observé des cellules cancéreuses dans 1 à 3 ganglions situés près du côlon ou du rectum</p>
T1 N2a M0	<p>La tumeur a envahi la couche de tissu conjonctif qui entoure la muqueuse, soit la sous-muqueuse.</p> <p>Il y a des métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux. On a observé des cellules cancéreuses dans 4 à 6 ganglions situés près du côlon ou du rectum.</p>

Stade IIIB

TNM	Description
T3 ou T4a N1 M0	<p>L'un des énoncés suivants s'applique :</p> <ul style="list-style-type: none"> • la tumeur a envahi la sous-séreuse (une des couches externes entre la musculéuse et la séreuse) du côlon ou du rectum; • la tumeur a envahi les tissus mous entourant le côlon et le rectum, soit les tissus péricolorectaux; • la tumeur a traversé la membrane qui recouvre et soutient le côlon et le rectum, soit le péritoine viscéral. <p>Il y a des métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux. On a observé des cellules cancéreuses dans 1 à 3 ganglions situés près du côlon ou du rectum.</p>
T2 ou T3 N2a M0	<p>L'un des énoncés suivants s'applique :</p> <ul style="list-style-type: none"> • la tumeur a envahi la couche musculaire externe épaisse du côlon ou du rectum appelée musculéuse; • la tumeur a envahi la sous-séreuse (une des couches externes) du côlon ou du rectum; • la tumeur a envahi les tissus mous entourant le côlon et le rectum, soit les tissus péricolorectaux. <p>Il y a des métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux. On a observé des cellules cancéreuses dans 4 à 6 ganglions situés près du côlon ou du rectum.</p>
T1 ou T2 N2b M0	<p>La tumeur a envahi la couche de tissu conjonctif qui entoure la muqueuse, soit la sous-muqueuse, ou la couche musculaire externe épaisse du côlon ou du rectum appelée musculéuse.</p> <p>Il y a des métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux. On a observé des cellules cancéreuses dans au moins 7 ganglions situés près du côlon ou du rectum</p>

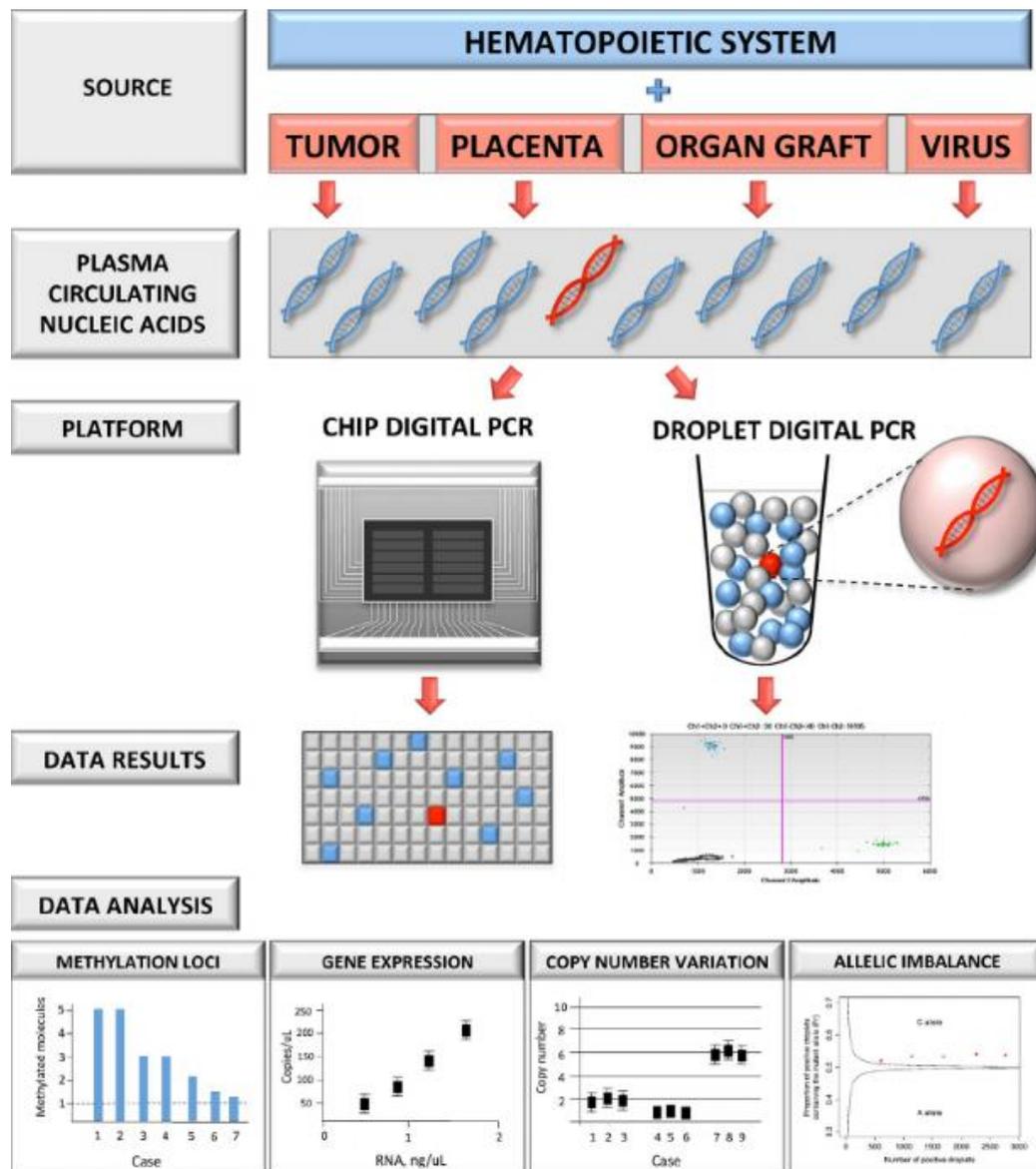
Stade IIIC

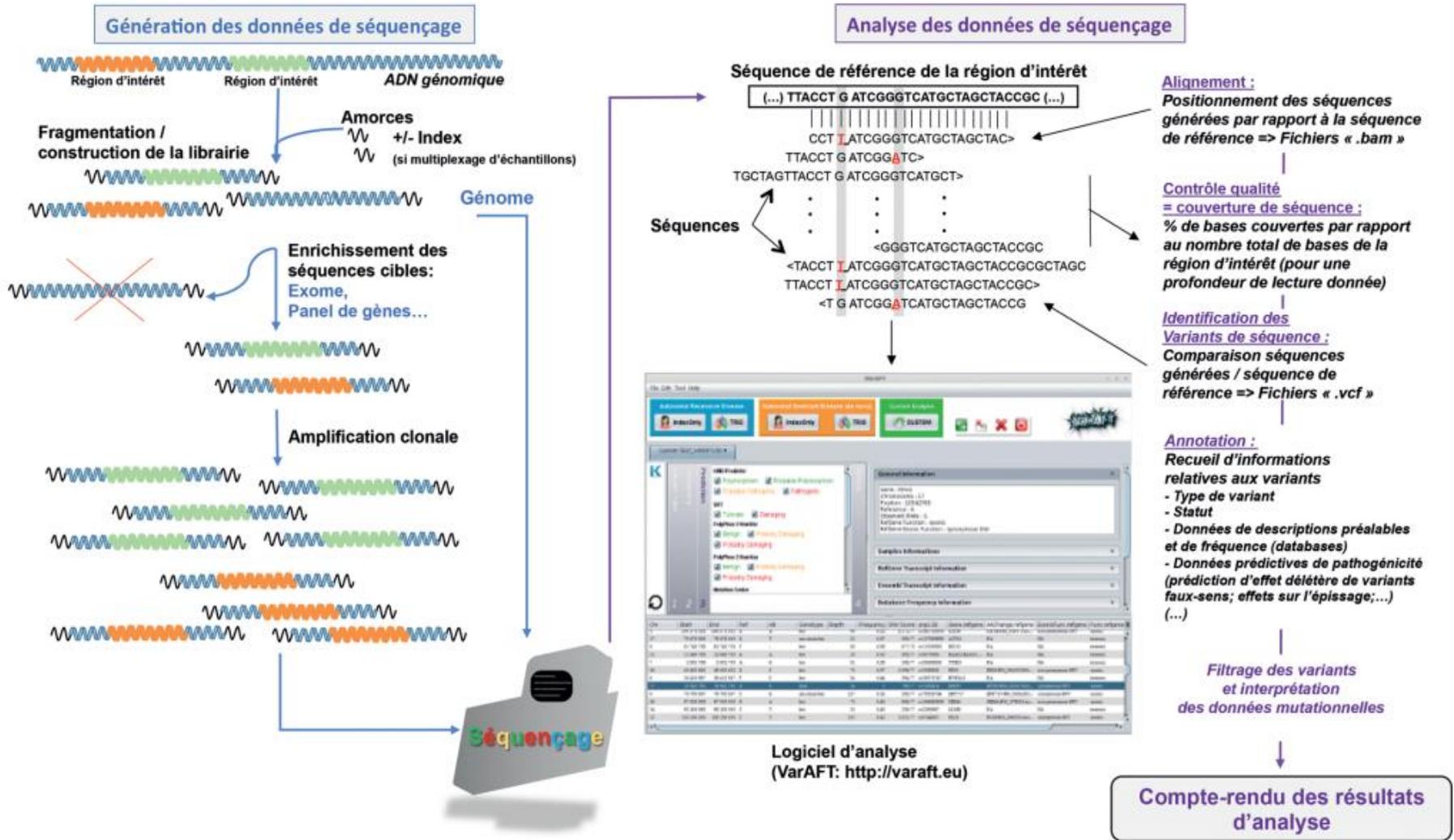
TNM	Description
T4a N2a M0	La tumeur a traversé la membrane qui recouvre et soutient le côlon et le rectum, soit le péritoine viscéral. Il y a des métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux. On a observé des cellules cancéreuses dans 4 à 6 ganglions situés près du côlon ou du rectum.
T3 ou T4a N2b M0	L'un des énoncés suivants s'applique : <ul style="list-style-type: none"> • la tumeur a envahi la sous-séreuse (une des couches externes) du côlon ou du rectum; • la tumeur a envahi les tissus mous entourant le côlon et le rectum, soit les tissus péricolorectaux; • la tumeur a traversé la membrane qui recouvre et soutient le côlon et le rectum, soit le péritoine viscéral. Il y a des métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux. On a observé des cellules cancéreuses dans au moins 7 ganglions situés près du côlon ou du rectum
T4b N1 ou N2 M0	La tumeur a traversé la paroi du côlon ou du rectum jusque dans d'autres organes ou structures. Il y a des métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux (présence de cellules cancéreuses dans des ganglions situés près du côlon ou du rectum).

Stade IV

Stade	TNM	Description
Stade IVA	Tout T Tout N M1	La tumeur a traversé n'importe quelle couche du côlon ou du rectum Il peut y avoir des métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux (présence possible de cellules cancéreuses dans des ganglions situés près du côlon et du rectum). Il y a des métastases à distance (le cancer s'est propagé à d'autres parties du corps). Le cancer a envahi 1 seul organe, comme le foie ou un poumon, ou des ganglions lymphatiques éloignés
Stade IVB	Tout T Tout N M1b	La tumeur a traversé n'importe quelle couche du côlon ou du rectum. Il peut y avoir des métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux (présence possible de cellules cancéreuses dans des ganglions situés près du côlon et du rectum). Il y a des métastases à distance (le cancer s'est propagé à d'autres parties du corps). Le cancer a envahi plus d'un organe ou bien le péritoine (membrane qui tapisse les parois de l'abdomen et du bassin et qui recouvre et soutient la plupart des organes abdominaux).

Annexe 2 : Représentation schématique de différents types de PCR digitale





Company/Platform	Sequencing	Amplification	Read length	Max. Output	Run time	Pros/Cons
Roche 454 GS FLX+	SBS Pyro	emPCR	700 bp* (SE, PE)	700 Mb	10–23 h	Pro: Long reads, short run time Con: High Mb cost, homopolymer errors
Roche 454 GS Junior	SBS Pyro	emPCR	400 bp* (SE, PE)	35 Mb	10 h	Same as GS FLX+ Additional Con: Lowest output of small scale instruments
Illumina HiSeq 1000	SBS RDT	Bridge PCR	36–101 bp (SE, PE)	≤150 Gb	1.5–8.5 days	Pro: Ultra high output, ease of use Con: No run scalability like SOLiD 5500
Illumina HiSeq 2000	SBS RDT	Bridge PCR	36–101 bp (SE, PE)	≤300 Gb	2.5–11 days	Same as HiSeq 1000
Illumina GAIIx	SBS RDT	Bridge PCR	36–151 bp (SE, PE)	≤95 Gb	2–14 days	Pro: Mature platform Con: Superseded by HiSeq, higher Mb cost
Illumina MiSeq	SBS RDT	Bridge PCR	36–151 bp (SE, PE)	>1 Gb	4–27 h	Pro: Proven chemistry, fully automated workflow Con: Unproven instrument
Illumina HiScanSQ	SBS RDT	Bridge PCR	100 bp (SE, PE)	≤150 Gb	1.5–8.5 days	Pro: Dual use instrument (microarray) Con: Higher Mb cost than HiSeq
Life Technologies 5500	SBL	emPCR	35–75 bp (SE, PE)	77 Gb	2–7 days	Pro: Ultra high output, scalable runs allow sequencing on part flow cell Con: Shorter reads than other platforms, longer time to clonal template prep than Illumina
Life Technologies 5500XL (4hp)	SBL	emPCR	35–75 bp (SE, PE)	155 Gb	2–7 days	Same as 5500
Life Technologies Ion Torrent	SBS H+	emPCR	316+318 chip >100 bp (SE)	316–>100 Mb 318–>1 Gb	2 h+	Pro: Label-free chemistry– cheap and fast, highly scalable, long read length potential Con: Homopolymer errors, no PE yet, laborious template preparation but semi-automatable

Note: Specifications for all platforms were derived from company websites. *Mode read length: the individual fragment read length is variable. SBS = Sequencing-by-synthesis; Pyro = Pyrosequencing; RDT = reverse dye terminator chemistry; H+ = Hydrogen ion detection; SBL = Sequencing-by-ligation; emPCR = emulsion PCR; SE = Single-end read; PE = Paired-end read; Mb = Megabases; Gb = Gigabases; bp = base pairs.

Annexe 5 : Les principales caractéristiques des billes magnétiques streptavidine

User Guide

PureProteome™ Streptavidin Magnetic Beads

Introduction

PureProteome Streptavidin Magnetic Beads are para-magnetic beads covalently coupled with recombinant streptavidin for the binding of biotinylated molecules. They are ideal for a range of applications, including purification of proteins and nucleic acids, immunoprecipitation, drug discovery, cell isolation, protein interaction studies, and organelle isolation.

The beads are added to a sample containing biotinylated molecules (e.g., proteins, DNA/RNA, antibodies, peptides, sugars, or lectins). During a short incubation, the biotinylated molecule will bind to the beads. The beads are then isolated using the PureProteome Magnetic Stand, followed by several wash steps to remove unbound molecules.

Benefits

- Ready to use
- High binding capacity
- Low non-specific binding
- May be used over broad pH range (4.5–9.0) and temperature range (4–25 °C)

The beads are not blocked and the user may choose a block appropriate for their application.

Materials Required but Not Supplied

Biotinylated protein or ligand of interest

Wash Buffer: Tris-buffered saline with Tween® 20 surfactant (TBST) or buffer of choice

Storage Buffer: Tris-buffered saline (TBS) or buffer of choice

1.5 mL microcentrifuge tubes

PureProteome Magnetic Stand (8-well)



For optimal performance, the PureProteome Magnetic Stand (8-well) is recommended for use with PureProteome Streptavidin Magnetic Beads.

Procedure for Using PureProteome Streptavidin Magnetic Beads

Coupling of a biotinylated protein or ligand to the Streptavidin Magnetic Beads

This protocol is a general guide and may be modified and optimized by the user to reflect a specific application.

1. Ensure that the magnetic beads are uniformly resuspended by vortexing or inverting. Mix the bead slurry between aliquots to ensure that the beads do not settle.
2. Aliquot 100 µL of magnetic bead suspension into a 1.5 mL microcentrifuge tube. This volume may be scaled up or down as required.
3. Place the tube into the PureProteome Magnetic Stand to collect the beads. Carefully remove storage buffer with a pipette.
4. Add 500 µL TBST or wash buffer of choice to the tube. Mix for 10 seconds, then place tube into magnetic stand. Allow the beads to migrate to the magnet, then carefully remove residual buffer without disturbing the beads.
5. Add 100–200 µL of biotinylated protein or ligand and incubate with gentle mixing for 15–60 minutes at room temperature.
6. Place tube into magnetic stand and allow beads to migrate to the magnet. Remove the unbound fraction and save for analysis. Bound material can be calculated by subtracting unbound fraction from the input material.
7. Wash the magnetic beads in 500 µL TBST or wash buffer of choice. Place the tube back into the magnetic stand and allow the beads to migrate to the magnet. Remove the TBST or wash buffer of choice.
8. Repeat the wash step 3 times.
9. Add 100 µL of TBS or storage buffer of choice to the washed beads and store at 2–8 °C.

Specifications

Presentation	5% slurry (v/v) in 10 mM Tris with 0.05% sodium azide, pH 8.0
Matrix	Recombinant streptavidin covalently coupled to silica-based beads
Particle form	Spherical
Bead diameter	10 µm (nominal)
Storage	2–8 °C. Do not freeze.
Capacity	Up to 0.65 µg biotinylated BSA per µL of bead suspension Up to 1.0 µg biotinylated IgG per µL of bead suspension <i>Note: Performance will vary depending on the properties of the individual proteins being used.</i> Up to 6 pmoles oligonucleotide per µL of bead suspension <i>Note: Binding capacity is inversely related to molecule size. For applications with oligonucleotides, please be aware that reduced binding capacity for large DNA fragments may be due to steric hindrance.</i>
Shelf life	Refer to expiration date on product label

PureProteome Streptavidin Magnetic Beads are for research use only. They are not for use in diagnostic procedures.

Disposal

Collect and dispose of used material according to all applicable international, federal, state, and local regulations.

Safety Data Sheet

Safety Data Sheets (SDS) are available on our web site. Go to www.millipore.com and enter your catalogue number in the search box.



Product Ordering Information

Description	Qty/Pk	Cat. No.
PureProteome Streptavidin Magnetic Beads	2 × 1 mL 1 × 10 mL	LSKMAGT02 LSKMAGT10
PureProteome Magnetic Stand, 8-well	1	LSKMAGS08
PureProteome Magnetic Stand, 15 mL	1	LSKMAGS15
PureProteome NHS FlexiBind Magnetic Beads Kit (contains 0.5 mL magnetic beads, equilibration, wash/coupling, and quench buffers, and Amicon® Ultra-0.5 devices)	1	LSKMAGN01
PureProteome NHS FlexiBind Magnetic Beads	4 × 0.5 mL	LSKMAGN04
PureProteome Nickel Magnetic Beads	2 × 1 mL 1 × 10 mL	LSKMAGH02 LSKMAGH10
PureProteome Protein A Magnetic Beads	2 × 1 mL 1 × 10 mL	LSKMAGA02 LSKMAGA10
PureProteome Protein G Magnetic Beads	2 × 1 mL 1 × 10 mL	LSKMAGG02 LSKMAGG10
PureProteome Albumin Magnetic Beads	1 × 10 mL	LSKMAGL10
PureProteome Albumin/IgG Depletion Kit (contains magnetic beads, buffer concentrate, and Amicon Ultra-4 devices)	1	LSKMAGD12

Notice

The information in this document is subject to change without notice and should not be construed as a commitment by Millipore Corporation ("Millipore") or an affiliate. Neither Millipore Corporation nor any of its affiliates assumes responsibility for any errors that may appear in this document.

Technical Assistance

For more information, contact the Millipore office nearest you. In the U.S., call 1-800-MILLIPORE (1-800-645-5476). Outside the U.S., go to our web site at www.millipore.com/offices for up-to-date worldwide contact information. You can also visit the tech service page on our web site at www.millipore.com/techservice.

Standard Warranty

The applicable warranty for the products listed in this publication may be found at www.millipore.com/es/cp3/terms (within the "Terms and Conditions of Sale" applicable to your purchase transaction).

Key Applications	Volume
Purification de molécules biotinylées, Purification de protéines	10 mL

Description	
Référence	LSKMAGT10
Nom de marque	<ul style="list-style-type: none"> PureProteome
Description	Système à base de billes magnétiques PureProteome™ Streptavidine
Aperçu	Les billes magnétiques PureProteome™ Streptavidine mettent à la disposition des chercheurs un système à base de billes puissant pour contribuer à purifier les molécules biotinylées. Cette bille convient aux immunoprécipitations, à la purification des acides nucléiques et à l'isolement de cellules et d'organelles.
Materials Required but Not Delivered	Support magnétique PureProteome™ (8 puits) (Réf. LSKMAGS08)

Applications	
Application	PureProteome Streptavidin Magnetic Beads provide researchers with a powerful bead system to help purify biotinylated molecules. This bead is suitable for immunoprecipitations, purifying nucleic acids, isolating cells and organelles.
Principales applications	<ul style="list-style-type: none"> Purification de molécules biotinylées Purification de protéines

Informations physico-chimiques	
Capacité de fixation	> 20 µg de protéines par mg de billes incubées

Dimensions	
Taille des particules	10 µm
Volume	10 mL

Notifications sur l'utilisation du produit

Notification sur l'utilisation

- Unless otherwise stated in our catalog or other company documentation accompanying the product(s), our products are intended for research use only and are not to be used for any other purpose, which includes but is not limited to, unauthorized commercial uses, in vitro diagnostic uses, ex vivo or in vivo therapeutic uses or any type of consumption or application to humans or animals.

Informations relatives au stockage et à l'expédition

Température de stockage

À la réception, stockez à 2–8 °C

Informations sur l'emballage

Quantité

10 ml

Résumé

Le cancer colorectal se forme dans le côlon ou dans le rectum, dans la dernière partie du gros intestin.

Le cancer colorectal donne très rapidement des métastases, notamment hépatiques et son apparition est asymptomatique. Ainsi, ce cancer est généralement diagnostiqué très tardivement, dans des stades avancés et avec plusieurs métastases. Pour assurer la meilleure prise en charge, il est très important de diagnostiquer ce cancer dans les stades précoces. Plusieurs types de biomarqueurs moléculaires ont été étudiés ; parmi eux l'ADN tumoral circulant est l'un des plus prometteurs.

Le BEAMing (*Bead, Emulsion, Amplification and Magnetics*) (Sysmex®) est une technique de PCR sur molécules d'ADN fixées sur billes magnétiques sur lesquelles se trouvent les amorces spécifiques du gène d'intérêt. Le seuil de détection d'ADN circulant est de 0.01%. L'utilisation de la méthode BEAMing dans la routine de diagnostic et dans l'organisation de traitement des différents cancers représente une piste très intéressante et prometteuse.

Mots-clés : Cancer colorectal, ADN circulants, BEAMing