



HAL
open science

Intérêt de l'ADN tumoral circulant dans la prise en charge clinique des cancers : dépistage, diagnostic, suivi de traitement et risque de récurrence

Lauranne Rogerat

► To cite this version:

Lauranne Rogerat. Intérêt de l'ADN tumoral circulant dans la prise en charge clinique des cancers : dépistage, diagnostic, suivi de traitement et risque de récurrence. Sciences pharmaceutiques. 2020. hal-03298111

HAL Id: hal-03298111

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03298111v1>

Submitted on 23 Jul 2021

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>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



FACULTÉ
DE PHARMACIE

UNIVERSITE DE LORRAINE
2020

FACULTE DE PHARMACIE

T H E S E

Présentée et soutenue publiquement

le 03 février 2020, sur un sujet dédié à :

**INTERET DE L'ADN TUMORAL CIRCULANT DANS LA
PRISE EN CHARGE CLINIQUE DES CANCERS : INTERET
DANS LE DEPISTAGE, DIAGNOSTIC, SUIVI DE
TRAITEMENT ET RISQUE DE RECIDIVE**

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Lauranne ROGERAT

née le 26 juin 1992

Membres du Jury

Président : Monsieur Jean Louis MERLIN, Professeur des Universités – praticien hospitalier
Juges : Monsieur Alexandre HARLE, Maîtres de conférences des universités – praticien hospitalier
Madame Céline GAVOILLE, Oncologue
Monsieur Alain Rupin, Pharmacien

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2019-2020

DOYEN

Raphaël DUVAL

Vice-Doyen

Julien PERRIN

Directrice des études

Marie SOCHA

Conseil de la Pédagogie

Présidente, Brigitte LEININGER-MULLER

Vice-Présidente, Alexandrine LAMBERT

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Présidente, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Présidente, Caroline GAUCHER

Chargés de Mission

Communication

Innovation pédagogique

Référente ADE

Référente dotation sur projet (DSP)

Marie-Paule SAUDER

Alexandrine LAMBERT

Virginie PICHON

Marie-Paule SAUDER

Responsabilités

Filière Officine

Filière Industrie

Filière Hôpital

Pharma Plus ENSIC

Pharma Plus ENSAIA

Pharma Plus ENSGSI

Cellule de Formation Continue et Individuelle

Commission d'agrément des maîtres de stage

ERASMUS

Caroline PERRIN-SARRADO

Julien GRAVOULET

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Marie SOCHA

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Xavier BELLANGER

Igor CLAROT

Luc FERRARI

François DUPUIS

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Francine PAULUS

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Pierre LEROY

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Jean-Claude BLOCK

Pierre DIXNEUF

Chantal FINANCE

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Vincent LOPPINET

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

François BONNEAUX

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Philippe MAINCENT
Alain NICOLAS
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

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

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

Section CNU

*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</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

Ariane BOUDIER ^H	85	<i>Chimie Physique</i>
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>Hématologie, Biologie cellulaire</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>
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

Alexandre HARLE	82	<i>Biologie cellulaire oncologique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Loïc REPEL	82	<i>Biothérapie</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES

Xavier BELLANGER	87	<i>Parasitologie, Mycologie médicale</i>
Emmanuelle BENOIT ^H	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN ^H	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Cédric BOURA ^H	86	<i>Physiologie</i>
Sandrine CAPIZZI BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Antoine CAROF ^H	85	<i>Informatique</i>

Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Florence DUMARCAÿ ^H	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS ^H	86	Pharmacologie
Reine EL OMAR	86	Physiologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER ^H	86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD ^H	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT ^H	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire

ENSEIGNANTS (suite)

Section CNU

*

Discipline d'enseignement

Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86/01	Droit en Santé
Christophe MERLIN ^H	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Arnaud PALLOTTA	86	Bioanalyse du médicament
Marianne PARENT	85	Pharmacie galénique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL ^H	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET ^H	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 ^H	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU ^H	87	Biochimie et Biologie moléculaire

PROFESSEUR ASSOCIE

Julien GRAVOULET	86	Pharmacie clinique
------------------	----	--------------------

PROFESSEUR AGREGE

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

⊠ En attente de nomination

^H Maître de conférences titulaire HDR

* 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

SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances

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 Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens

De coopérer avec les autres professionnels de santé

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

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

« 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 ».

REMERCIEMENT

A mon président de thèse, Monsieur le Professeur Jean Louis Merlin, *Professeur des universités – praticien hospitalier*

Pour l'honneur que vous me faites de présider cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Alexandre Harlé, *maître de conférences des universités – praticien hospitalier*

De m'avoir transmis son intérêt pour l'ADN tumoral circulant lors d'un stage de recherche et d'avoir accepté de diriger ce travail. Merci pour le temps accordé et pour l'accompagnement tout au long de l'écriture.

Aux membres du jury, Madame Céline Gavaille et Monsieur Alain Rupin

Pour l'honneur que vous me faites de siéger parmi les membres du jury, veuillez trouver l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je dédie cette thèse :

A mes parents,

Pour leur soutien indéfectible tout au long de ces études, merci infiniment d'avoir été là et de m'avoir encouragée.

A mon frère,

Pour son esprit de compétition, qui m'a poussé à finir cette thèse pour pouvoir la passer avant lui !

A Alexandre,

Pour être à mes côtés à chaque instant, merci de partager ma vie et d'avoir accepté de me suivre à Paris, où il y a beaucoup trop de monde à ton goût.

A mes ami(e)s de la fac,

Celles de la première année : Sarah, Cynthia, Marie-Emilie et Mary.

Ceux de ma promo : Gabriel, Orlane, Anne-Julie, Clément, Louise et Océane. Pour ces années passées à vos côtés, que ça soit sur les bancs de l'amphi ou en soirées...malgré la distance, vous êtes toujours dans mon cœur.

Et à tous les autres, de Nancy ou d'ailleurs : Maxime, Clothilde, Sylvain, Elodie, Antoine, Claire, Margaux, Juliette, Maxime, Florian, Marine, Viorica, Sylvanie, Eugénie et Justine... je pense que grâce à vous, j'ai fait 3 fois le tour de France avec des souvenirs étudiants plein la tête.

Aux bureaux de l'AAEPN 2013-2014 et 2014-2015 ainsi qu'au bureau Fédélor 2015-2016 : Pour tous les souvenirs que je garde de ces années d'associatifs, merci.

Table des matières

Abréviations et acronymes.....	11
1. Introduction.....	13
1.1. Généralités sur les cancers.....	13
1.2. Dépistage et diagnostic actuels.....	14
1.3. Traitement.....	15
2. L'ADN tumoral circulant.....	16
2.1 L'histoire de l'ADN tumoral circulant.....	16
2.2 L'origine de l'ADN tumoral circulant.....	17
2.3 L'analyse de l'ADN tumoral circulant.....	20
2.3.1 Caractéristiques.....	20
2.3.2 Avantage de la technique.....	21
2.3.3 Recommandations pré-analytiques.....	22
2.3.3.1 Type de prélèvement.....	22
2.3.3.2 Conditionnement.....	26
2.3.4 Extraction de l'ADN.....	27
2.3.4.1 La méthode utilisée :.....	27
2.3.4.2 Modification du protocole :.....	33
2.3.4.3 Conditions de stockage.....	35
2.3.5 Méthodes analytiques.....	39
2.3.5.1 Méthodes basées sur la PCR quantitative.....	39
2.3.5.2 Méthodes basées sur la PCR digitale.....	44
2.3.5.3 Méthodes basées sur la technique NGS.....	46
3. Applications cliniques de l'ADN tumoral circulant.....	49
3.1. Marqueur théranostique.....	49
3.2. Monitoring.....	53
3.3. Pronostic.....	56
3.4. Le dépistage.....	58
4. Design des essais cliniques utilisant l'ADN tumoral circulant.....	62
5. Conclusion.....	69

Liste des figures :

Figure 1: Schéma comparatif des altérations morphologiques caractéristiques de la nécrose et de l'apoptose.	17
Figure 2 : Les différentes origines cellulaires de l'ADN tumoral circulant retrouvé dans la circulation sanguine des patients atteints de cancer	18
Figure 3 : Répartition des tailles de fragments chez les sujets atteints de cancer et chez les volontaires sains.	20
Figure 4: Sources possibles de biopsie liquide : chaque liquide acellulaire a un potentiel de diagnostic intéressant en fonction du cancer développé par le patient.....	22
Figure 5 : Schéma représentant l'obtention du plasma et du sérum.....	23
Figure 6 : Concentrations d'ADN circulant dans le plasma et le sérum	24
Figure 7 : Comparaison des concentrations d'ADN tumoral entre des échantillons de plasma et de sérum.	24
Figure 8: Concentration d'ADN circulant plasmatique retrouvée en fonction des anticoagulants utilisés et de l'ADN tumoral de sérum.	25
Figure 9 : Comparaison des concentrations d'ADN tumoral circulant à différents temps retrouvés dans des échantillons conservés à température ambiante.....	26
Figure 10 : Concentration de l'ADN tumoral circulant dans le plasma de volontaires sains collectés dans différents tubes d'anticoagulants et analysés à différentes heures après le prélèvement et un stockage à température ambiante.....	26
Figure 11 : Déroulé d'une extraction d'ADN selon la méthode phénol-chloroforme.	28
Figure 12: Déroulé d'une extraction selon la méthode salting out.....	28
Figure 13: Principe d'utilisation du kit NucleoSpin plasma XS.....	29
Figure 14: Evaluation de l'ADN libre circulant en utilisant 4 kits d'extraction différents.	30
Figure 15 : Comparaison de 4 kits	31
Figure 16 : Procédé de la technologie de Magtration	31
Figure 17: Principe de la technologie des "rod".	32
Figure 18 : Représentation schématique du principe de filtration membranaire	32
Figure 19: Effet des modifications du protocole d'extraction sur la concentration d'ADN circulant retrouvée.	35
Figure 20 : Effets des conditions pré-analytiques sur l'ADN provenant de plasma et de sérum.....	37
Figure 21 : Effets de différentes températures de stockage de l'ADN circulant.....	37
Figure 22: Effet du nombre de cycle de congélation/décongélation.....	38
Figure 23: Comparaison de la concentration d'ADN tumoral circulant en fonction des cycles de congélation/décongélation avant extraction.....	38
Figure 24 : Etude de l'influence de la durée de conservation des échantillons plasmatiques à -80°C en fonction de la variation de concentration de l'ADN circulant (k).	39
Figure 25: Principe de la PCR en temps réel grâce à une sonde TaqMan	40

Figure 26 : Principe de la PCR allèle-spécifique.....	40
Figure 27: Les principes des différentes COLD-PCR possible pour l'analyse du génome.	41
Figure 28: Principe de la méthode Bi-PAP-A.....	42
Figure 29: Principe de la PCR avec méthylation spécifique.	43
Figure 30: Schéma représentant la méthode Intplex®	43
Figure 31: Principe de la méthode MassArray.....	44
Figure 32 : Principe de la ddPCR.....	45
Figure 33: Principe de la procédure BEAMing.....	46
Figure 34: Principe général du séquençage à haut débit.....	47
Figure 35: Evolution du taux d'ADN tumoral circulant pour un patient donné	57
Figure 36: Détection des différents cancers par le test CancerSeek	61
Figure 37: Schéma représentant le principe de l'étude DNA-OPTIMAL.....	64

Liste des tableaux :

Tableau 1: Comparatif des conditions pré-analytiques et résultats de l'ADN circulant dans différentes études	36
Tableau II: Récapitulatif des études démontrant la concordance entre la détection de marqueur théranostique par biopsie tissulaire et ADN tumoral circulant.....	51

Abréviations et acronymes.

ACTB : Actine Beta

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ALUJ : *Arthrobacter luteus* J

ARMS : Amplification refractory mutation system

ARN : Acide ribonucléique

AS-PCR : PCR allele spécifique

BEAMing : Beads, Emulsions, Amplification and Magnetics

BI-PAP-A: bidirectional pyrophosphorolysis-activated polymerization

BPER : Basé sur le taux d'erreur de position

BRAF : B-Virus-induced Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

CAM : molécules d'adhésion cellulaire

CAPP-seq : cancer personalized profiling by deep sequencing

CT scan : tomographie informatisée

ddPCR : Droplet Digital Polymerase Chain Reaction

DII : index d'intégrité.

DNases : désoxyribonucléases.

dNTP : désoxyribonucléotides triphosphate

EBV : Epstein Barr Virus

G : Accélération radiale.

GADPH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

EMA : European Medicine Agency

FA : fréquence allèle

FDA : Food Drug Administration

HPRT : Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase

HR: hazard ratio

IC: intervalle de confiance

iDES : integrated digital error suppression

IRM : imagerie par resonance magnétique

kb : kilobases.

KRAS : Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

MALDITOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight

ml : millilitre

mmHg : millimètre de mercure

ng : nanogramme

NIH3T3 : Lignée continue de cellules fibroblastiques de souris Swiss albinos.

NGS : Next-Generation Sequencing

NRAS : Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog

NTB : 2-nitro-5-thiobenzoate

NTI : Guanidium Thiocyanate

OS : overall survival

PAP : pyrophosphorolysis-activated polymerization

PASA : PCR Amplification d'allèle spécifique

pb : paire de base

PCR : Polymerase chain reaction

PER : Taux d'erreur de position

PFS : progression free survival

PI3KCA : Serine/thréonine protéine Kinase

qPCR : PCR quantitative

Rep-Seq : representative sequencing

RT : température ambiante.

SDS : Dodecyl sulfate de sodium

SIMsen-seq : Simple, multiplexed, PCR-based barcoding of DNA for sensitive mutation detection using sequencing

SGM: survie globale médiane

SNP : polymorphisme mono nucléotidique

SNV : Variation mono nucléotidique

TERT : Telomerase Reverse Transcriptase

µl : microlitre

VAF : fréquence d'allèle variable.

1. Introduction

1.1. Généralités sur les cancers

Les cancers constituent la deuxième cause de mortalité dans le monde. En effet, un décès sur six (Foreman *et al.*, 2014) est dû aux cancers. Selon l'agence internationale de recherche sur le cancer, en 2012, les principaux types de cancers sont (International Agency for Research on Cancer, 2012) :

- le cancer du poumon avec 1,67 million de nouveaux cas et 552 000 décès.
- le cancer du foie avec 782 000 nouveaux cas et 746 000 décès.
- le cancer colorectal avec 1,6 million de nouveaux cas et 694 000 décès.
- le cancer du sein avec 528 000 nouveaux cas et 266 000 décès.

Le cancer résulte d'un déséquilibre de l'homéostasie cellulaire par défaut des systèmes de régulation régissant cette homéostasie. Cette défaillance est la conséquence d'altérations génétiques touchant les cellules du corps humain. Trois classes de gènes sont le plus souvent touchées par ces altérations génétiques : les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes clés de la réparation de l'ADN.

Une cellule est considérée comme tumorale lorsque l'accumulation de ces altérations a permis à la cellule d'acquies ces dix propriétés fondamentales (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011) :

- L'autosuffisance vis-à-vis des signaux de croissance.
- L'insensibilité aux signaux antiprolifératifs.
- La résistance à l'apoptose, résultant de l'inactivation de gènes inducteurs de la mort cellulaire.
- Un potentiel répliatif illimité.
- La capacité d'angiogenèse.
- Un phénomène invasif et métastatique.
- Une dérégulation métabolique.
- Un échappement à la réponse immunitaire.
- Une inflammation oncogénique.
- Une instabilité génomique qui entraîne la progression tumorale.

1.2. Dépistage et diagnostic actuels

Chaque localisation cancéreuse a son propre mode de révélation tumorale. Cependant, on peut déduire la plupart des symptômes révélateurs selon la physiopathologie provoquée, le mode de développement des cancers et ce, quelle que soit la localisation. Malgré tout, le plus souvent, la découverte d'un cancer résulte d'un test de dépistage qui a donné un résultat positif (Hermine, 2018). Différents examens peuvent être réalisés pour confirmer ou non le diagnostic d'un cancer (Casaux, 2018).

- L'imagerie médicale est aujourd'hui un des principaux outils de diagnostic des cancers. Elle permet d'obtenir des images, plus ou moins précises selon la technique employée, des organes internes et de visualiser ainsi les éventuelles tumeurs qu'ils présentent. Ces images apportent des informations sur la localisation, la taille et le stade évolutif des lésions tumorales.
- La biopsie : il s'agit d'un prélèvement de tissus suspects permettant de les examiner au microscope. Cet examen est presque toujours nécessaire pour établir un diagnostic de cancer : c'est le seul moyen de savoir si une anomalie est bénigne ou maligne et, le cas échéant, de connaître le type de cancer.
- La prise de sang, utilisée pour doser certains marqueurs tumoraux. Les marqueurs tumoraux sont des molécules produites en excès par les cellules cancéreuses. Ainsi une concentration augmentée d'un marqueur tumoral dans le sang, ou les urines, peut correspondre à la présence d'une tumeur dans l'organisme.

A l'issue de l'examen clinique et de l'examen anatomopathologique de la biopsie, si les résultats laissent penser que les cellules cancéreuses ont pu migrer vers des parties du corps éloignées de l'organe malade (métastases), d'autres examens d'imagerie peuvent être réalisés.

Lorsque le diagnostic est confirmé, ces différents examens peuvent préciser la nature et le degré d'évolution de la tumeur et également détecter la présence d'éventuelles métastases. L'ensemble de ces données permet de mettre en place un traitement adapté.

1.3. Traitement

Traiter un cancer consiste à éliminer la tumeur et à supprimer les cellules cancéreuses.

Les traitements ont pour but de réduire le risque de récurrence, augmenter la durée de vie, améliorer la qualité de vie, voire de guérir le patient. Ces objectifs varient selon le type de cancer et son stade d'évolution.

La chirurgie, lorsqu'elle est possible, consiste en une exérèse de la lésion tumorale avec une marge de sécurité de 5 cm (Lechaux and Bouygues, 2019). Un curage des ganglions drainant la partie retirée doit être également effectué dans l'éventualité d'une dissémination des cellules cancéreuses. La chirurgie peut être utilisée seule ou en combinaison avec d'autres traitements (Stanford Health Care). En traitement unique, la chirurgie s'adresse aux formes localisées de cancers, découverts à un stade précoce.

La radiothérapie est un traitement locorégional des cancers qui utilise des radiations pour détruire les cellules cancéreuses tout en épargnant les tissus sains périphériques. Cette méthode consiste à délivrer par fractions la dose de radiations nécessaire à la destruction des cellules cancéreuses. Le fractionnement de la dose d'irradiation permet aux tissus sains touchés par les radiations de se régénérer (National Cancer Institute, 2018). Afin d'ajuster au mieux le volume irradié au volume de la tumeur tout en épargnant au maximum les tissus sains avoisinants, 4 à 6 orientations de faisceaux peuvent être utilisées. La forme du champ irradié sera adaptée à la forme du volume tumoral.

La chimiothérapie consiste à administrer au patient une ou plusieurs molécules, dites cytotoxiques, destinées à détruire le plus spécifiquement possible les cellules cancéreuses (Pruthi et al., 2017). Pour les tumeurs au stade le plus avancé, la chimiothérapie adjuvante est recommandée après la chirurgie pour réduire le risque de récurrence.

L'hormonothérapie empêche l'action d'hormones susceptibles de stimuler la croissance des cellules cancéreuses (INCa, 2008). Ce traitement est utilisé dans les cancers dits hormonosensibles ou hormonodépendants

Les thérapies ciblées sont des techniques qui ciblent de manière spécifique des effecteurs des voies de signalisation impliquées dans les cancers (Tsimberidou, 2015). Les molécules thérapeutiques utilisées ont pour cibles des récepteurs cellulaires, ou leurs ligands, souvent surexprimés.

2. L'ADN tumoral circulant

2.1 L'histoire de l'ADN tumoral circulant

La première description d'acide nucléique acellulaire dans le sang humain a été réalisée en 1948 par Mandel et Métais (P. Mandel and Metais, 1948). A ce moment, cette découverte a peu intéressé la communauté scientifique.

Des anomalies du cancer ont été observées quelques décennies plus tard avec la découverte de quantités extractibles d'ADN dans le plasma de patients atteints de cancer et son absence dans les témoins sains, ce qui a suggéré une certaine corrélation avec la malignité. (Leon *et al.*, 1977; Stroun *et al.*, 1987).

Il a ensuite été démontré en 1989 qu'il s'agissait d'ADN tumoral libéré par des cellules tumorales détruites et que l'on y retrouvait par conséquent les possibles mutations somatiques (Forsheaw *et al.*, 2012). L'amélioration de la sensibilité des techniques de biologie moléculaire permet aujourd'hui la détection de cet ADN tumoral circulant.

Ce n'est qu'en 1994 que la présence de l'acide nucléique libre a été révélée comme le résultat de la détection de fragment de gènes *KRAS* mutés dans le sang de patients atteints de cancer. Sorenson *et al.* ont démontré que des séquences de gènes à copie unique pouvaient être identifiées dans le plasma normal et que les séquences d'oncogènes mutés pouvaient être détectées et identifiées dans le plasma ou le sérum de patients atteints de tumeurs malignes (Sorenson *et al.*, 1994). Vasioukhin *et al.*, ont démontré que des taux accrus d'ADN plasmatique ont été observés chez des patients souffrant de diverses maladies malignes (Vasioukhin Valeri *et al.*, 1994).

En 1996, Chen *et al.* ont étudié les microsatellites de patients atteints de carcinomes pulmonaires à petites cellules et ont démontré que l'analyse micro-satellitaire du plasma représentait une nouvelle méthode pour la détection de l'ADN tumoral circulant (Chen *et al.*, 1996).

Ainsi les mutations et les translocations identifiées dans les tumeurs peuvent être retrouvées dans l'ADN tumoral circulant et signent la présence d'ADN d'origine tumorale. L'une des caractéristiques majeures de l'ADN tumoral circulant 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 de d'ADN tumoral circulant. Depuis, des altérations somatiques spécifiques de l'ADN tumoral ont pu être détectées dans le plasma de nombreux cas de cancers.

2.2 L'origine de l'ADN tumoral circulant

Dans la circulation sanguine, des fragments d'ADN sont libérés en grande proportion lors du renouvellement cellulaire ou d'autres formes de mort cellulaire par cellules normales de l'organisme (Holdenrieder and Stieber, 2004; Lecomte *et al.*, 2010; Stroun *et al.*, 2001). On parle alors d'ADN libre circulant, dont la concentration physiologique est de moins de 25ng/ml (Giacona *et al.*, 1998).

En effet, au cours du cycle cellulaire, le processus apoptotique se produit : la rétractation progressive de la cellule avec condensation de la chromatine et du cytoplasme est suivie d'une fragmentation de l'ADN qui se retrouve ensuite dans la circulation sanguine. A ce mécanisme s'ajoute celui de la nécrose, où les cellules présentes gonflent à tel point que la membrane cellulaire éclate, déversant leurs contenus cellulaires, dont l'ADN, dans le tissu environnant (Figure 1).

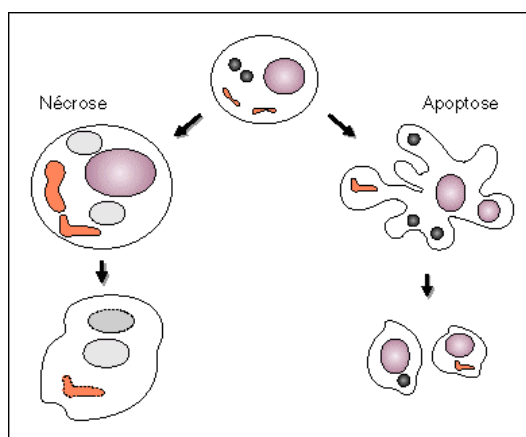


Figure 1: **Schéma comparatif des altérations morphologiques caractéristiques de la nécrose et de l'apoptose.** (SCOAZEC, 1997)
La nécrose est caractérisée par une augmentation du volume cellulaire et aboutit à l'éclatement de la cellule et de ses organites.
L'apoptose est caractérisée par une rétraction progressive de la cellule, la fragmentation de son noyau dont la chromatine se condense. L'apoptose aboutit à la formation de fragments cellulaires, les corps apoptotiques, contenant des fragments nucléaires et des organites morphologiquement intacts.

En situation tumorale, à travers divers mécanismes, les cellules malignes et l'ensemble des cellules constituant le microenvironnement tumoral participent à la libération de l'ADN libre circulant : Perkins *et al.*, ont démontré que l'ADN plasmatique chez les patients atteints de cancer provenait de l'ADN tumoral libéré par les cellules tumorales détruites (Perkins *et al.*, 2012). Plus précisément, on a découvert que l'ADN tumoral circulant portait des altérations génétiques associées aux tumeurs et, par conséquent, pendant plus d'une décennie, il a été considéré comme un marqueur diagnostique potentiel du cancer pour un test non invasif (Fleischhacker and Schmidt, 2007; Fournié *et al.*, 1995; Gormally *et al.*). D'autres études ont mis en évidence que la fraction d'ADN circulant qui est dérivée des tumeurs peut atteindre jusqu'à 10% de la quantité globale d'ADN libre (Diehl *et al.*, 2005, 2008; Stroun *et al.*, 1989). Cette fraction, qui est nommée l'ADN tumoral circulant, a été associée à la charge tumorale et à la progression maligne (Figure 2).

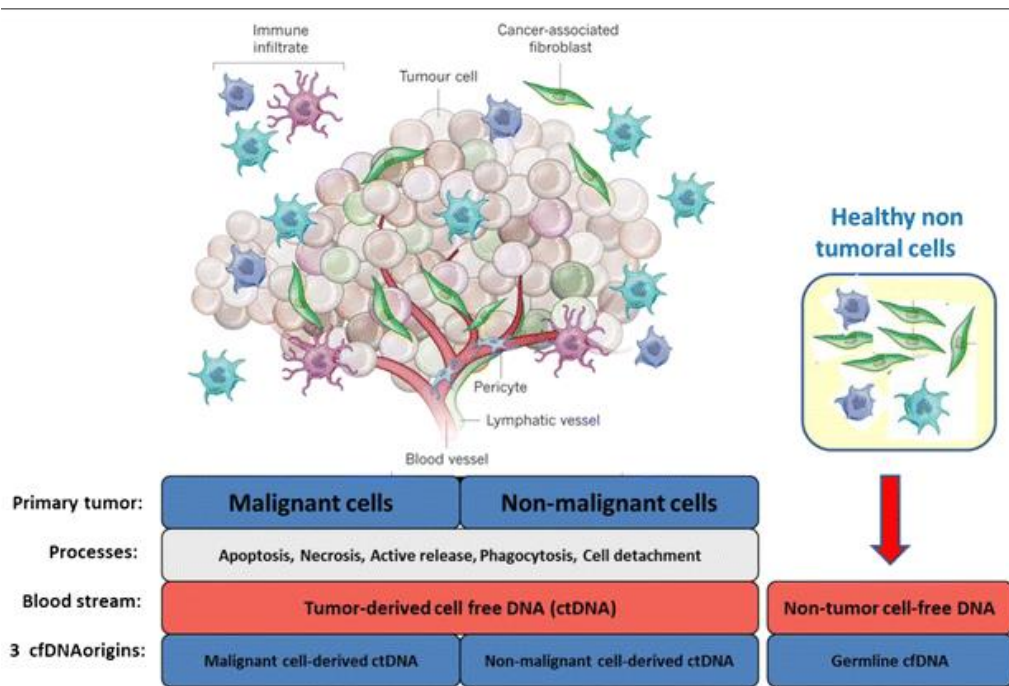


Figure 2 : Les différentes origines cellulaires de l'ADN tumoral circulant retrouvé dans la circulation sanguine des patients atteints de cancer (Thierry et al., 2016).

Dans le cas du développement de tumeurs solides, la croissance rapide de ces dernières entraîne une altération de la formation des vaisseaux sanguins. Cette altération conduit à l'apparition de zones hypoxiques au sein de ces tumeurs, dont les conditions artérielles sont comprises entre 5 et 10mmHg (G. L. Semenza, 2009). Dans les cas extrêmes, ces zones hypoxiques peuvent entraîner l'apparition de vastes zones nécrotiques au sein de la tumeur. Dans les cas les plus modérés, ces zones peuvent induire des modifications du métabolisme cellulaire, ce qui se traduit par l'entrée des cellules en autophagie ou par mort cellulaire par apoptose (Carmeliet and Jain, 2000).

Cependant ces processus n'expliquent pas tout, la quantité d'ADN libre circulant qui est retrouvée chez les patients atteints de cancer est supérieure à ce qui pourrait être mesuré par la masse de cellules présentes dans la circulation (Van Der Vaart and Pretorius Piet, 2008). En effet, il a été mis en évidence une augmentation de la quantité de cet ADN libre circulant : environ 180ng par millilitre (Jahr et al., 2001; Leon et al., 1977). Sorenson a calculé que 1000 cellules cancéreuses par millilitre seraient nécessaires pour fournir la quantité d'ADN libre circulant retrouvée chez les patients atteints de cancer (Sorenson, 1997), quantité qui est bien au-dessus de ce que peut expliquer l'apoptose ou la nécrose.

D'autres hypothèses ont ainsi été avancées pour expliquer la quantité augmentée de l'ADN libre circulant retrouvée chez les patients atteints de cancer.

L'une d'elles est le mode de propagation du cancer. En effet, Schwarzenbach et al. ont démontré que les cellules tumorales circulant dans le sang et les dépôts micro-métastatiques peuvent également contribuer à la libération de l'ADN libre circulant (Schwarzenbach et al., 2009, 2011; Schwarzenbach Heidi et al., 2007). Que ce soit par voie sanguine ou lymphatique, les

cellules tumorales peuvent quitter la tumeur initiale et conduire ainsi à la formation de métastases. Cette invasion de la matrice extracellulaire se fait par détachement cellulaire avec la mise en jeu de différents acteurs (Namer *et al.*). Il est à noter que de nombreuses cellules ne survivent pas à ce détachement cellulaire et rentrent en apoptose à la suite de l'action de :

- La diminution ou perte des CAM, composant transmembranaires des jonctions intercellulaires spécialisées, notamment des E-cadhérines.
- L'augmentation de l'activité des protéases extracellulaires, principalement des sérine-protéases et des métallo protéases, qui dégradent la matrice extracellulaire (Bidard, 2008)
- La stimulation de la sécrétion des facteurs de mobilités autocrines orientent le mouvement des cellules tumorales infiltrantes.

Cette contribution a été associée à la progression maligne et à la charge tumorale (Goebel *et al.*, 2005).

Une autre hypothèse avancée par Garcia-Olmo *et al.* est la génométastase qui permet, via le sang, le transfert d'ADN des cellules infectées à des cellules isolées. Ils ont en effet observé la capacité d'induire une transformation néoplasique de la lignée cellulaire NIH3T3 à partir du plasma de modèles murins avec xénogreffe tumorale (García-Olmo *et al.*, 1999, 2000). Par la suite, ils ont observé des résultats similaires à partir du plasma de patients (García-Olmo *et al.*, 2012, 2010). Ainsi, la majorité de l'ADN libre circulant proviendrait des cellules cancéreuses vivantes (Anker *et al.*, 1975; Chen *et al.*, 2005).

2.3 L'analyse de l'ADN tumoral circulant

2.3.1 Caractéristiques

Initialement la taille de l'ADN tumoral circulant a été estimée comme étant comprise entre 500 pb et plus de 30 kb (Giacona *et al.*, 1998). Cependant, des études plus récentes ont décrit des fragments d'ADN tumoral circulant plus petits : de 70 à 200 pb pour les petits fragments et d'environ 21 kb pour les plus gros (Fan *et al.*, 2010; Jahr *et al.*, 2001).

Cette variabilité de taille (Figure 3) est la conséquence des multiples origines de l'ADN tumoral circulant qui induisent des mécanismes de fragmentations différents. En effet, la taille des fragments de l'ADN tumoral circulant provenant de l'apoptose est de 180-200pb (Jiang *et al.*, 2015; Mouliere *et al.*, 2013). Les fragments provenant du processus de nécrose ont une taille comprise entre 100pb et plus de 10kb (Jahr *et al.*, 2001). Cette différence de taille s'explique par la dégradation « aléatoire » de l'ADN par les endonucléases activées (Carmaux, 2008; Lacave *et al.*, 2005).

Vogelstein *et al.* ont montré qu'il y avait une fragmentation plus importante de l'ADN en provenance de cellules tumorales due à l'enrichissement tumoral des fragments courts d'ADN (100pb) (Vogelstein *et al.*, 2013). L'observation de fragments de moins de 145 pb chez les patients atteints de cancer indique que la dégradation, soit par voie enzymatique, soit par phagocytose, se produit dans la circulation après la libération de l'ADN par mort cellulaire ou sécrétion active (Wu *et al.*, 2002).

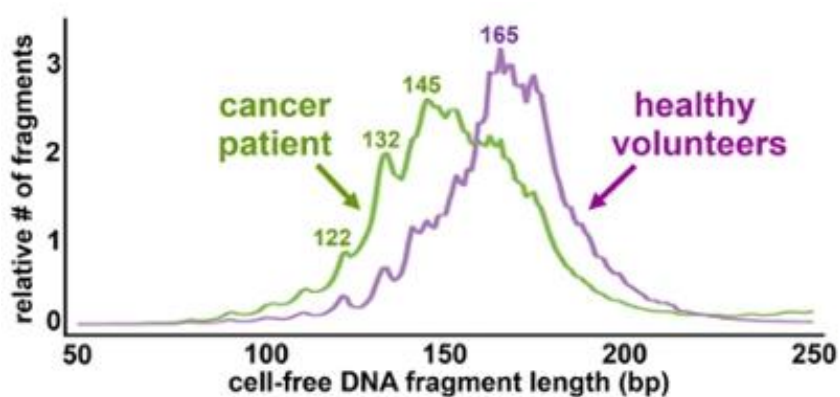


Figure 3 : Répartition des tailles de fragments chez les sujets atteints de cancer et chez les volontaires sains.(Underhill *et al.*, 2016)
En vert : la courbe de répartition de la taille des fragments chez les patients atteints de cancer.
En violet : la courbe de répartition de la taille des fragments d'ADN tumoral circulant chez les patients sains.
On peut ainsi constater que, de manière générale, les fragments d'ADN tumoral circulant sont plus petits chez les patients atteints de cancer que chez les personnes saines.

La variabilité des taux de l'ADN tumoral circulant n'est pas encore clairement définie. La quantité, allant de 1 copie dans 5 millilitres de sang à 1 million, serait fonction de la charge tumorale, du stade cancéreux,... Les taux d'ADN tumoraux circulant ont été mis en corrélation avec la charge tumorale et la réponse au traitement (Diehl *et al.*, 2008) mais également avec le type de tumeurs et dépendant des individus (Thierry *et al.*, 2010)

La demi-vie de l'ADN tumoral circulant est courte. Elle a été initialement estimée à environ 16 minutes, selon une étude sur l'ADN fœtal dans le sang maternel (Lo *et al.*, 1999). Mais de récents travaux en oncologie ont démontré que chez des patients dont le plasma était prélevé de manière séquentielle après résection complète de leur tumeur, le temps de demi-vie de l'ADN tumoral circulant était de 114 minutes (Bettegowda *et al.*, 2014; Diehl *et al.*, 2005, 2008; Lecomte *et al.*, 2010).

2.3.2 Avantage de la technique

Les applications de la détection de l'ADN tumoral circulant sont multiples, en particulier la détermination de la résistance acquise à la thérapie ciblée, l'analyse des mutations somatiques de la tumeur et l'évolution de cette dernière après le traitement (Schwarzenbach *et al.*, 2011). Jusqu'à présent, toutes ces applications sont effectuées à partir d'une biopsie tissulaire, alors que cette biopsie ne contient pas nécessairement toutes les caractéristiques d'un cancer (Vasioukhin *et al.*, 1994).

Les biopsies liquides ont couramment été incorporées dans les études précliniques et cliniques pour leurs aspects de "précision oncologique" (Cai *et al.*, 2015). L'utilisation d'une biopsie liquide offre la possibilité d'obtenir des échantillons sanguins répétés, là où les biopsies tissulaires sont rarement acceptées ou acceptables pour le patient (Tsui and Berger, 2016). La biopsie liquide permet ainsi de suivre les modifications de l'ADN tumoral circulant pendant l'évolution naturelle de la maladie ou pendant le traitement du cancer (Schwarzenbach *et al.*, 2011). De plus, les biopsies tissulaires, dans certains cancers et/ou répétées chez un même patient, ne sont pas toujours techniquement possibles et ne sont pas sans risque (Bosc *et al.*, 2015). Dans tous ces cas, l'utilisation de l'ADN tumoral circulant est une alternative vers laquelle les chercheurs se sont tournés ces dernières années.

Pour réaliser une biopsie liquide, deux techniques ont été développées : le dosage de l'ADN tumoral circulant ou le dosage des cellules tumorales circulantes (Bettegowda *et al.*, 2014). La comparaison de ces deux dosages dans de nombreuses études a permis de conclure que l'abondance d'ADN tumoral circulant donne de meilleures spécificité et sensibilité dans les méthodes classiques de dépistage des protéines sériques ou des ultrasons (Haber and Velculescu, 2014; Heitzer *et al.*, 2013a).

Exploiter la demi-vie courte de l'ADN tumoral circulant représente un aspect pratique, utile pour les cliniciens qui recherchent rapidement des signes précoces de rechute. Il permet en effet de fournir des mesures temporelles de la charge tumorale et d'identifier les mutations survenant pendant le traitement, contrairement à l'imagerie et la biopsie tissulaire (Dawson *et al.*, 2013; Diaz *et al.*, 2013; Leary *et al.*, 2012; Murtaza *et al.*, 2013).

De plus, avec l'ADN tumoral circulant, les risques de "sur-diagnostic" dus aux faux positifs des tumeurs bénignes ne posent pas de problème majeur contrairement à tout autre test de dépistage (Brooks, 2012). En effet, il a été montré que les tumeurs bénignes et les conditions

néoplasiques ne libèrent pas d'ADN tumoral circulant (Diehl *et al.*, 2005). En revanche, d'autres études ont mis en évidence qu'une tumeur contenant environ 50 millions de cellules malignes libérait suffisamment d'ADN pour que l'ADN tumoral circulant soit détectable alors que ce nombre était insuffisant pour diagnostiquer un cancer par imagerie (Diaz *et al.*, 2012).

2.3.3 Recommandations pré-analytiques.

2.3.3.1 Type de prélèvement

L'ADN peut être analysé dans tous liquides corporels donnant accès aux matériaux dérivés de la tumeur, comme la salive (Aro *et al.*, 2017), les selles (Zhai *et al.*, 2016), l'urine (Reckamp *et al.*, 2016), le liquide céphalo-rachidien (Ballester *et al.*, 2018) ou le sang (Figure 4: Sources possibles de biopsie liquide : chaque liquide acellulaire a un potentiel de diagnostic intéressant en fonction du cancer développé par le patient (Peng *et al.*, 2017) . Actuellement le prélèvement sanguin est la source d'ADN tumoral la plus étudiée, notamment parce qu'elle permet la détection du plus grand nombre de cancers. C'est pourquoi nous ne nous focaliserons que sur le prélèvement sanguin pour l'analyse de l'ADN tumoral circulant.

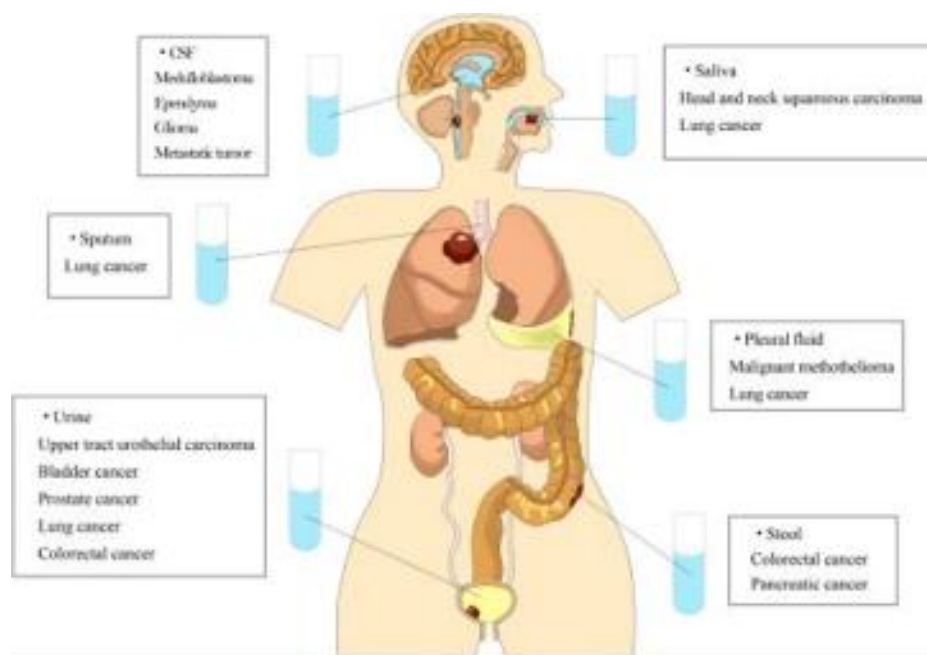


Figure 4: Sources possibles de biopsie liquide : chaque liquide acellulaire a un potentiel de diagnostic intéressant en fonction du cancer développé par le patient (Peng *et al.*, 2017)

Après la collecte du prélèvement sanguin, la première étape pré-analytique est de déterminer quel type d'échantillon va permettre l'analyse de l'ADN tumoral circulant : du plasma ou du sérum.

Le plasma est obtenu de sang total prélevé dans un tube contenant un anticoagulant. Le sang total est ensuite centrifugé pour séparer par gravité les cellules sanguines de leur liquide biologique composé à 91% d'eau qui contient, entre autres, des solutés minéraux, des gaz respiratoires, des nutriments, des protéines plasmatiques (albumine, fibrinogène, lipoprotéines, ...).

Le sérum se fait également à partir d'un tube de sang total mais ce dernier ne contient pas d'anticoagulant. Le sang n'étant pas un produit stable, il coagule rapidement, ce qui permet d'obtenir une masse semi-solide appelée "coagulum". Ce coagulum est ensuite centrifugé pour séparer la fibrine et les cellules sanguines du sérum. Le sérum est essentiellement composé d'eau avec des protéines dissoutes ainsi que de divers ions tels que du sodium, des chlorures...

Ainsi le plasma et le sérum ont une composition similaire : la coagulation nécessaire à l'obtention du sérum prive ce dernier de fibrinogène et de protéine de coagulation contrairement au plasma (Figure 5).

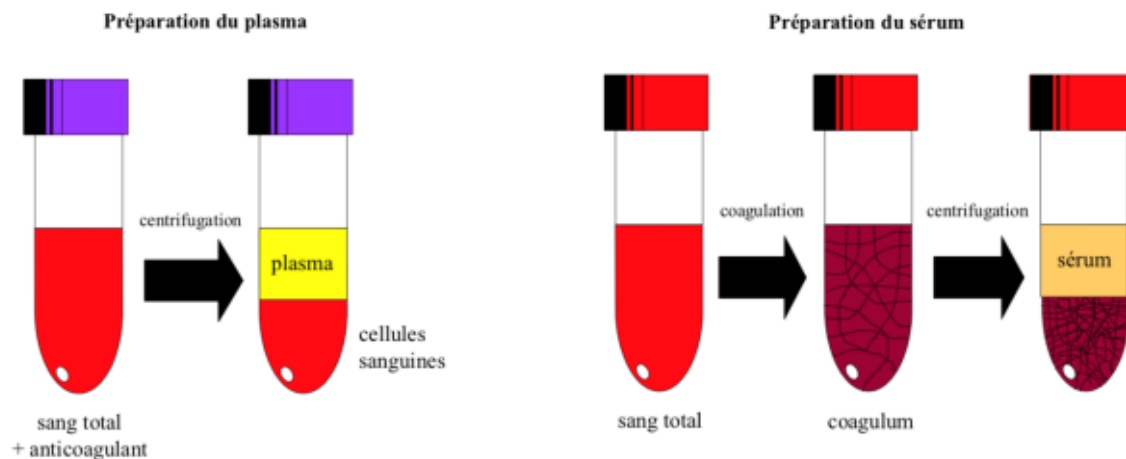


Figure 5 : Schéma représentant l'obtention du plasma et du sérum

A gauche : du sang total est récupéré dans un tube. Sans anticoagulant, il coagule formant ainsi le coagulum qui est centrifugé. On obtient ainsi le sérum.

A droite : préparation du plasma : du sang total est récupéré dans un tube contenant un anticoagulant puis est centrifugé afin de récupérer le plasma.

Diverses publications décrivent la quantification de l'ADN tumoral circulant retrouvé dans le sérum ou le plasma (Board *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2004).

Toutes ces études ont démontré que, certes, l'ADN tumoral circulant était retrouvé en plus grande quantité dans le sérum que dans le plasma des patients mais que cette quantité présentait également une grande variabilité interindividuelle (Figure 6 et Figure 7).

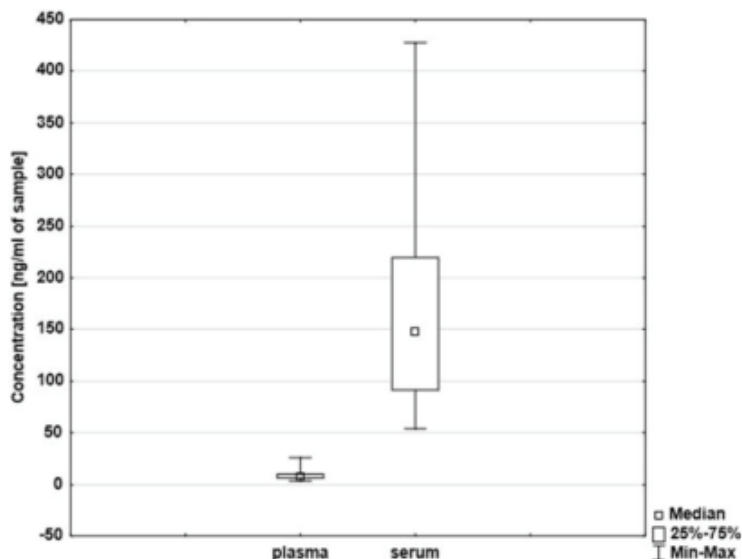


Figure 6 : Concentrations d'ADN circulant dans le plasma et le sérum

Les boîtes montrent différentes concentrations (en ng/ml) d'ADN circulant dans les échantillons de plasma et de sérum mesurées par qPCR pour une seule copie de gène 36B4 (n=36) (Zinkova et al., 2017).

La boîte représente l'intervalle contenant 25-75% des échantillons, le carré la médiane des concentrations et les barres sont le minimum et le maximum des concentrations retrouvées.

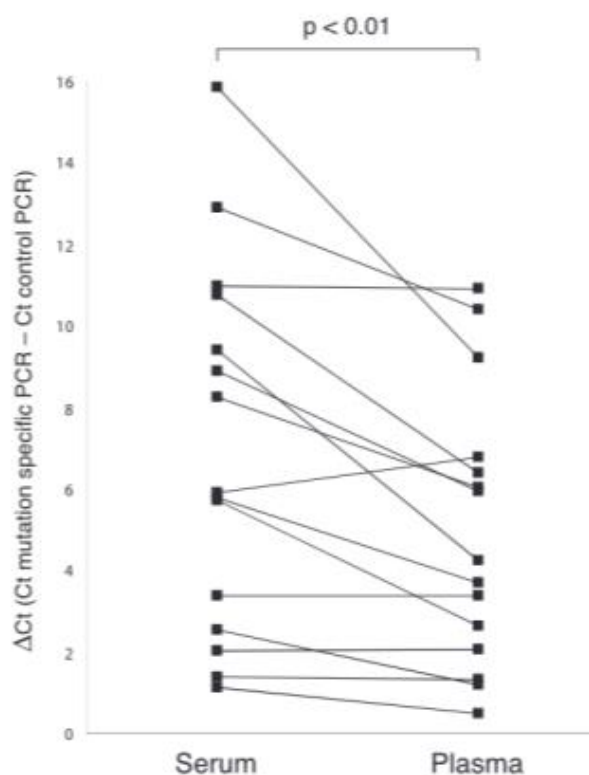


Figure 7 : Comparaison des concentrations d'ADN tumoral entre des échantillons de plasma et de sérum. Chaque paire plasma-sérum provient d'un même patient. Les patients présentent tous une mutation EGFR (substitution L858R ou délétion de l'exon 19) dans leurs tumeurs. Les concentrations sont significativement plus basses dans les échantillons de patients mesurés à partir de plasma que celles mesurées dans le sérum (Vallée et al., 2013).

D'autres études se sont penchées sur ces différences quantitative et qualitative (Board et al., 2008; Lui et al., 2002; Van Der Vaart Maniesh and Pretorius Piet J., 2008). Les différentes équipes ont émis l'hypothèse d'une possible lyse des globules blancs et des cellules hématopoïétiques lors du processus de coagulation. Ainsi l'ADN cellulaire lysé affecterait le taux d'ADN tumoral circulant

présent dans les échantillons de sérum. Cette contamination fait du sérum une source non fiable pour déterminer la quantité d'ADN tumoral circulant (Bronkhorst *et al.*, 2015; El Messaoudi *et al.*, 2013).

De plus, les plaquettes sont le principal producteur de microparticules qui jouent un rôle clé dans la production de thrombine. Les plaquettes étant absentes du sérum, on peut envisager une perte de microparticules plaquettaires, et par conséquent une perte d'ADN tumoral circulant (Berckmans *et al.*, 2001).

Considérant la variabilité quantitative interindividuelle amoindrie et le risque de contamination cellulaire plus faible des échantillons plasmatiques, il est recommandé d'utiliser le plasma comme source d'analyse de l'ADN circulant, en particulier l'ADN tumoral.

Afin d'obtenir une quantité de matériel suffisante pour réaliser les analyses de l'ADN tumoral circulant, il est nécessaire de recueillir entre 5 à 10ml de sang auprès des patients (Perkins *et al.*, 2012). Ce sang est recueilli dans des tubes traités avec un anticoagulant pour éviter ainsi une trop grande contamination par l'ADN leucocytaire.

Dans le but d'harmoniser les analyses de l'ADN tumoral circulant, les différents anticoagulants actuellement utilisés dans les laboratoires ont été étudiés. Plusieurs études ont ainsi démontré que l'héparine était un inhibiteur de PCR (Beutler *et al.*, 1990; Jung *et al.*, 1997) et qu'il n'était, par conséquent, pas le choix le plus judicieux. La concentration d'ADN tumoral circulant détectée étant supérieure dans les tubes traités avec de l'EDTA que dans ceux traités à l'héparine ou au citrate, il sera l'anticoagulant préférentiellement choisi pour cette analyse (El Messaoudi *et al.*, 2013) (Figure 8).

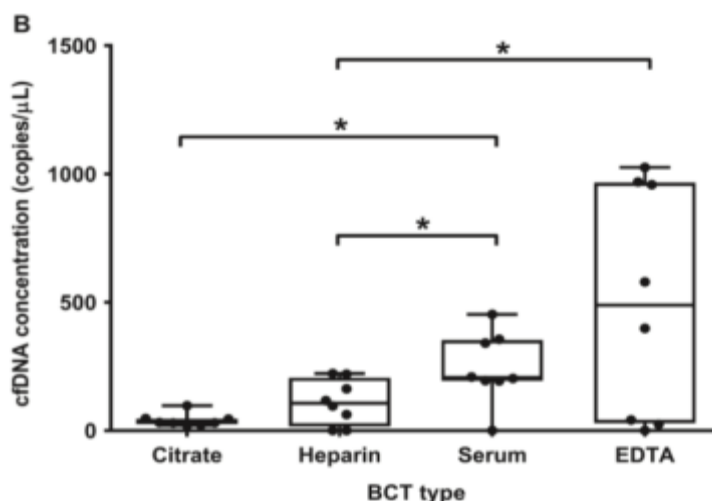


Figure 8: Concentration d'ADN circulant plasmatique retrouvée en fonction des anticoagulants utilisés et de l'ADN tumoral de sérum (Ginkel *et al.*, 2017).

La ligne du milieu de chaque boîte représente le 50^{ème} percentile, le haut et le bas des boîtes sont respectivement les 75^{ème} et les 25^{ème} percentiles. Les limites hautes et basses des barres représentent respectivement les 90^{ème} et les 10^{ème} percentiles.

L'EDTA est l'anticoagulant qui permet d'observer la plus grande concentration d'ADN libre circulant. De plus, la concentration observée est supérieure à celle observée dans le sérum.

2.3.3.2 Conditionnement

La présence d'activité des DNases et autres nucléases fait que l'ADN tumoral circulant présente une stabilité limitée dans le sang. Les résultats de Messaoudi *et al.* indiquent que la concentration en ADN reste stable jusqu'à 4h après le prélèvement mais augmente de manière significative après 6h (El Messaoudi *et al.*, 2013) (Figure 9). Sans précautions de conditionnement, il faut que l'analyse se fasse dans les 6 heures qui suivent le prélèvement (Dolfus *et al.*, 2016; Haber and Velculescu, 2014; Lam *et al.*, 2004) (Figure 10).

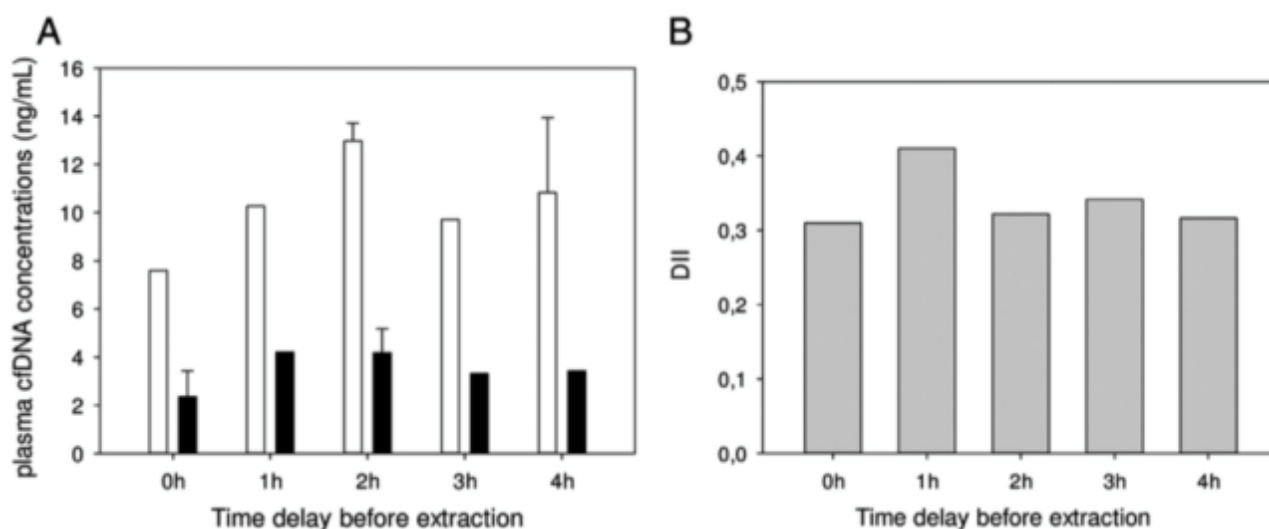


Figure 9 : Comparaison des concentrations d'ADN tumoral circulant à différents temps retrouvés dans des échantillons conservés à température ambiante.

A : Concentration d'ADN tumoral circulant dans le plasma en fonction du temps avant extraction. Les bâtons blancs correspondent aux échantillons provenant de souris xénotreffées avec une lignée cellulaire humaine KRAS sauvage et les bâtons noirs sont des échantillons humains présentant KRAS sauvage.

B : Etude de l'indice d'intégrité de l'ADN à différents intervalles de temps avant extraction.

La concentration d'ADN tumoral circulant est stable dans les 4h qui suivent le prélèvement (El Messaoudi *et al.*, 2013).

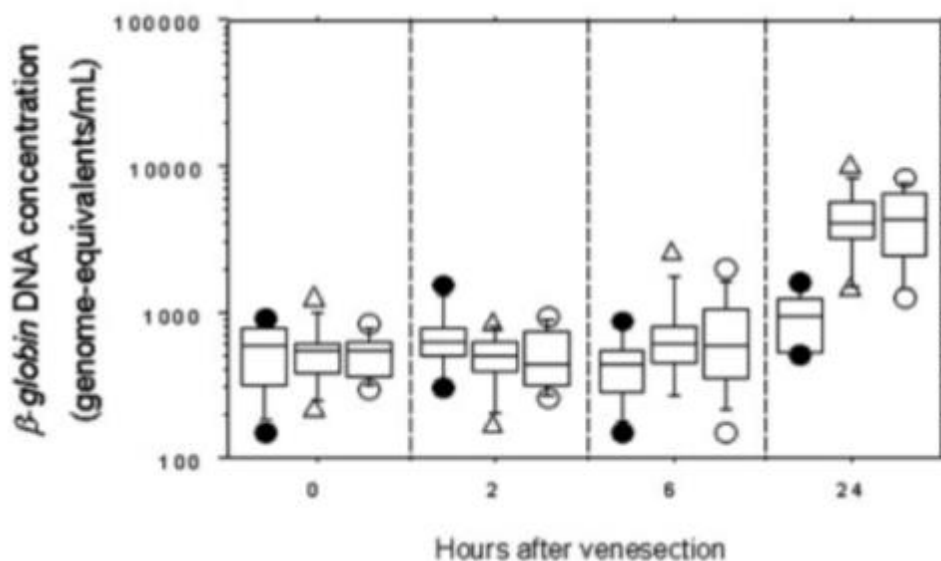


Figure 10 : Concentration de l'ADN tumoral circulant dans le plasma de volontaires sains collectés dans différents tubes d'anticoagulants et analysés à différentes heures après le prélèvement et un stockage à température ambiante (Lam *et al.*, 2004)

●, EDTA ; Δ , héparine ; \circ , citrate.

La différence de concentration d'ADN circulant, avant et après 6h, est statistiquement significative alors qu'elle ne l'était pas aux différents intervalles de temps étudiés avant 6 heures.

Le conditionnement consiste à isoler le plasma des cellules sanguines de l'échantillon de sang prélevé.

Des études ont testé différents protocoles de conditionnement des échantillons de sang (Chiu *et al.*, 2001; Swinkels *et al.*, 2003). Il a ainsi été démontré que pour obtenir une fraction plasmatique libre de cellules résiduelles deux protocoles étaient les plus adaptés :

- le protocole comportant une centrifugation suivie d'une filtration.
- le protocole comportant deux étapes de centrifugation : la première à 1 600g pendant 10 minutes puis la seconde, qui peut être réalisée avant ou après la congélation/décongélation, à 16 000g pendant 10 minutes. Les études plus récentes préconisent ce protocole.

2.3.4 Extraction de l'ADN.

Avant de débiter l'extraction d'ADN, qui est la dernière étape du parcours pré analytique de conditionnement des échantillons, les tubes de prélèvement sont retournés afin d'homogénéiser les échantillons. Une centrifugation dite douce est ensuite réalisée pour ne pas lyser les leucocytes, afin de ne pas libérer l'ADN contenu dans les cellules (Perkins *et al.*, 2012).

L'extraction a fait l'objet de nombreuses études comparatives afin de déterminer quelles méthodes et quels protocoles étaient les plus efficaces.

2.3.4.1 La méthode utilisée :

Bien que de nombreuses études comparatives aient été effectuées durant les années 2000, aucune méthode commerciale ou académique n'a pu se démarquer en termes d'efficacité d'extraction (Xue *et al.*, 2009). Les différentes méthodes ayant été analysées sont présentées ci-dessous.

Les méthodes classiques :

Les méthodes dites classiques sont des méthodes manuelles qui extraient l'ADN circulant grâce à des solutions chimiques de concentrations différentes.

L'une des premières méthodes développées a été l'extraction phénol-chloroforme développée en 1987 par Piotr Chomczynski (Chomczynski and Sacchi, 1987). Cela consiste en une extraction liquide-liquide pour isoler les acides nucléiques en séparant les protéines. Ce procédé de séparation repose sur la différence des acides nucléiques et des protéines en une émulsion en deux phases : phase aqueuse et phase organique (Figure 11).

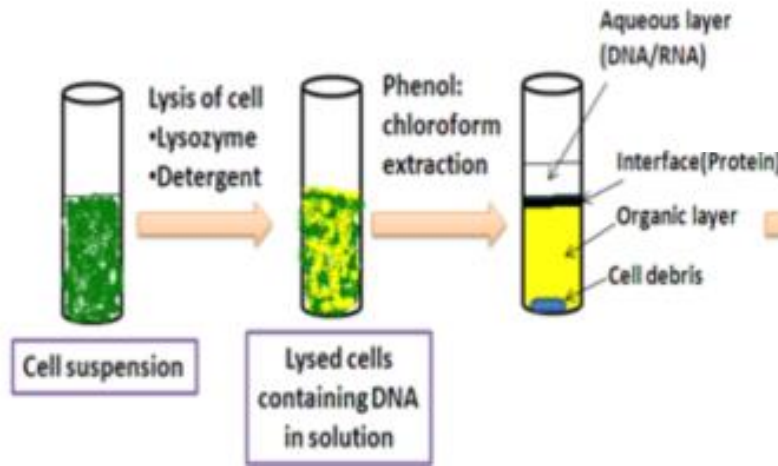


Figure 11 : Déroulé d'une extraction d'ADN selon la méthode phénol-chloroforme.

Un mélange de phénol-chloroforme est ajouté à l'échantillon contenant les cellules en suspension. La réaction a lieu, créant plusieurs couches : une phase aqueuse, une interface et une phase organique. La phase aqueuse contient l'ADN/l'ARN, l'interface contient les protéines présentes dans l'échantillon et la phase organique contient les débris cellulaires.

L'extraction "salting-out" a également été l'une des méthodes utilisées, basée sur l'influence de la force ionique sur les protéines. En effet, une force ionique élevée peut neutraliser certaines charges ioniques requises en surface pour le maintien de la solubilité, et rentrer en compétition avec les protéines pour les molécules d'eau disponibles en solution. Ainsi, quand la concentration en sel est assez élevée pour priver une protéine des molécules d'eau qui l'hydratent, celle-ci sort de solution et précipite. C'est ce qu'on appelle le phénomène de *salting-out*. Le sel le plus utilisé en laboratoire pour précipiter les protéines est le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Sa solubilisation n'affecte pas la température de la solution, il ne dénature pas les protéines et ne coûte pas cher (Erreur ! Source du renvoi introuvable.).

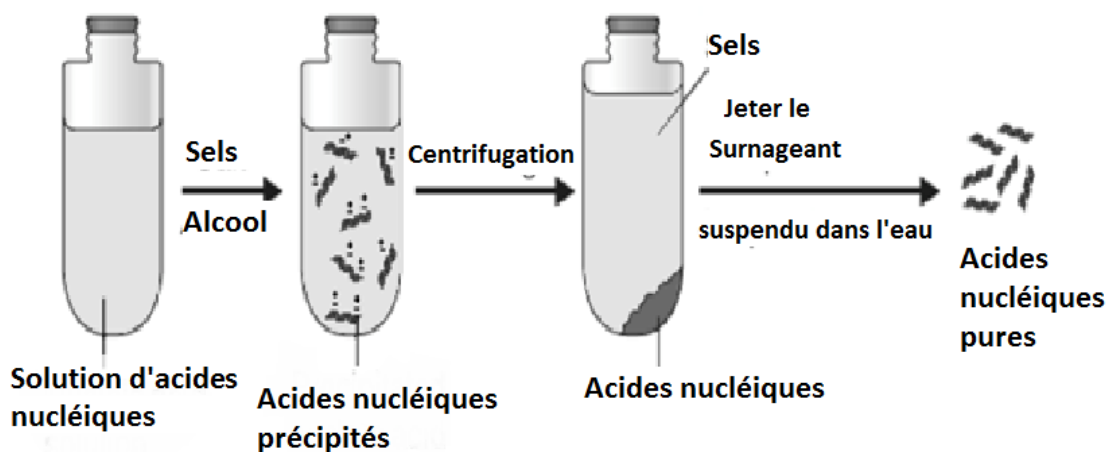


Figure 12: Déroulé d'une extraction selon la méthode salting out (Zumbo, 2016).

L'échantillon contenant l'ADN est précipité avec une solution salée puis est ensuite centrifugé. Les acides nucléiques se retrouvent au fond du culot, le surnageant peut ensuite être éliminé. Les acides nucléiques ainsi isolés sont mis en suspension dans de l'eau pour les analyses ultérieures.

- résine Guanidine/Promega Wizard : cette méthode consiste à ajouter un sel de guanidine, réputé pour être un agent chaotropique, à l'échantillon pour dénaturer les protéines. L'échantillon est ensuite purifié par la silice, en raison de sa capacité à capter l'ADN malgré la forte concentration de sels chaotropes (Boom *et al.*, 1990; Chen and Thomas, 1980; Marko *et al.*, 1982). Ces sels sont ensuite éliminés avec un produit de lavage à base d'alcool et l'ADN est élué dans une solution de faible force ionique telle que le tampon Tris-EDTA ou l'eau.

Les kits d'extraction des acides nucléiques :

Ces dernières années, des kits ont été élaborés contenant tous les réactifs (solutions) prêts à l'emploi avec le matériel nécessaire pour permettre d'extraire l'ADN rapidement. Parmi ces kits, les plus utilisés sont :

- Macherey Nagel Nucleospin plasma XS kit. Le petit diamètre de la membrane NucleoSpin® Plasma XS permet une élution efficace dans seulement 5 à 20 µL, ce qui permet d'obtenir les concentrations d'ADN les plus élevées (Figure 13).

NucleoSpin® Plasma XS procedure



Figure 13: Principe d'utilisation du kit NucleoSpin plasma XS (BIOKE)

- Le Qiagen QIAamp DNA blood mini kit et le Qiagen QIAamp circulating nucleic acid kit. Ces kits sont conçus pour traiter 200µl de sang (ou autres liquides organiques) préalablement traité avec un anticoagulant. Avec ces kits, le temps d'extraction est évalué à 20 à 40 minutes de préparation. Ces kits offrent une purification de l'ADN sur des colonnes de silice.

La membrane QIAamp à base de silice lie les acides nucléiques dans l'échantillon lysé, tandis que le reste du lysat est rapidement éliminé par pression de vide. Les acides nucléiques liés sont efficacement lavés pour éliminer les contaminants, puis élués dans un volume de 20 µl ou 60 µl.

Plusieurs travaux ont comparé l'efficacité des différents kits commercialisés à extraire l'ADN circulant et leur capacité à le détecter. 4 kits d'extraction différents ont été comparés en évaluant la quantité de gènes TERT et ALUJ retrouvée dans des échantillons plasmatiques: QIAamp circulating nucleic acid kit (Qiagen), Nucleospin Plasma XS kit (Macherey-Nagel), Fit Amp plasma/serum DNA isolation kit (EpiGentek) et QIAamp DNA blood kit (Qiagen) (Devonshire *et al.*, 2014; Page *et al.*, 2013) (Figure 14).

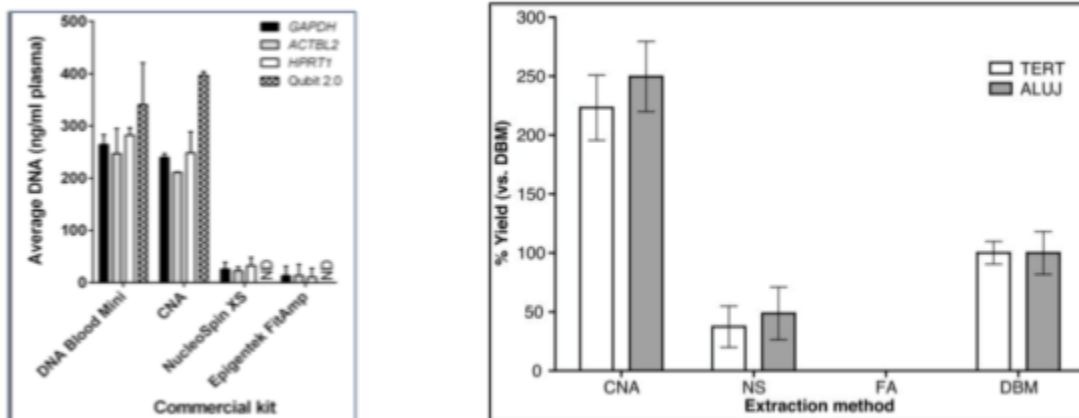


Figure 14: Evaluation de l'ADN libre circulant en utilisant 4 kits d'extraction différents.

(Page *et al.*, 2013): les 4 kits sont de gauche à droite : QiAamp DNA blood kit, QIAamp circulating nucleic acid kit, Nucleospin Plasma XS kit, Fit Amp plasma/serum DNA kit. L'efficacité des kits est évaluée sur leur capacité à quantifier la présence de protéines codantes, traduisant la présence du gène ACTB (bâton gris), HPRT (bâton blanc). La quantification de GAPDH (bâton noir) est utilisée comme référence lors de cette évaluation alors que la quantification par Qubit 2.0 (bâton hachuré) traduit la quantité d'ADN présent dans les échantillons. Ainsi on voit que les kits les plus efficaces sont le QiAamp DNA blood kit et le QIAamp circulating nucleic acid kit.

ND : non détectable.

(Devonshire *et al.*, 2014) : CNA pour QiAamp circulating nucleic acid kit, NS pour Nucleospin Plasma XS kit, FA pour Fit Amp plasma/serum DNA isolation kit et DBM pour QiAamp DNA blood kit. L'efficacité des kits est évaluée sur leur capacité à quantifier la présence du gène cible TERT (bâton blanc) et de la cible génomique AluJ (bâton gris).

Plus récemment, d'autres kits commerciaux ont été développés pour l'analyse d'acides nucléiques circulant, comme EpiQuick Circulating Cell-Free DNA Isolation Kit (EpiGentek), NEXTprep-Mag cfDNA Isolation Kit (SanBio), PME free-circulating DNA Extraction Kit (Analytik Jena), Maxwell RSC ccfDNA Plasma Kit (Promega). Une analyse comparative a été réalisée afin de les comparer sur leur efficacité et leur taux de détection (Sorber *et al.*, 2016). Il en est ressorti que les kits commercialisés par Promega et Qiagen étaient comparables et nettement plus efficaces que les autres kits (Figure 15).

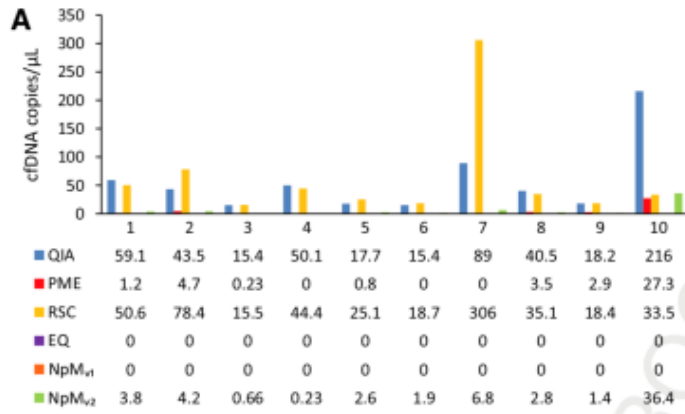


Figure 15 : Comparaison de 4 kits : QIAamp circulating nucleic acid kit (QIA), PME free-circulating DNA Extraction Kit (PME), Maxwell RSC ccfDNA Plasma Kit (RSC), EpiQuick Circulating Cell-free DNA Isolation kit (EQ) et 2 versions consécutives de NEXTprep-Mag cfDNA Isolation kit (NpMv1/NpMv2). Les hautes détections des échantillons 7 et 10 par les kits RSC et QIA, respectivement, sont significativement différentes des détections des autres kits, cela est certainement dû à une contamination des échantillons. Aucun signal n'a été détecté dans les échantillons analysés par les kits EQ et NpMv1

Les méthodes automatiques :

L'automatisation s'est répandue dans le domaine de l'extraction de l'ADN grâce au développement des technologies innovantes de l'instrumentation en biologie moléculaire. Actuellement, les appareils les plus utilisés sont capables d'extraire l'ADN en moins de 3 heures et ce, d'une façon totalement automatique.

Les extracteurs automatiques utilisent plusieurs technologies :

- Technologie « Magtration » qui automatise la méthode d'extraction magnétique. Des particules magnétiques sont situées à l'intérieur d'une pointe pour séparer l'acide nucléique contenu dans l'échantillon. (Figure 16)

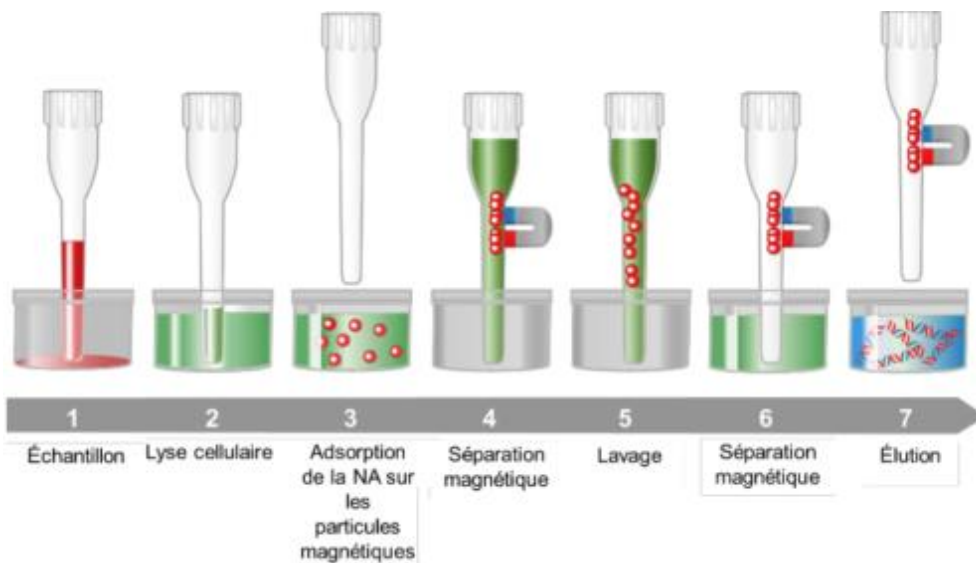


Figure 16 : Procédé de la technologie de Magtration (Precision System Science Co, Ltd, 2017)

Après préparation de l'échantillon (1), les protéines contenues dans l'échantillon sont lysées (2). L'acide nucléique est absorbé par des particules magnétiques (3) avec une surface hydrophile en utilisant un ion chaotropique et de l'alcool. (4) Les particules magnétiques sont récupérées à partir du tampon de réaction par la technologie de l'alcool. (6) Les particules magnétiques sont récupérées à partir du tampon de lavage par le tampon d'éluat et l'éluat est récupéré dans le tube de collecte.

- Technologie des « rod » qui utilise des tiges magnétiques. Ces tiges, en s'activant créent un champ magnétique qui attire les perles sur lesquelles on peut transférer l'ADN. Lorsque que ces tiges sont désactivées, les perles restent en suspension (Figure 17).

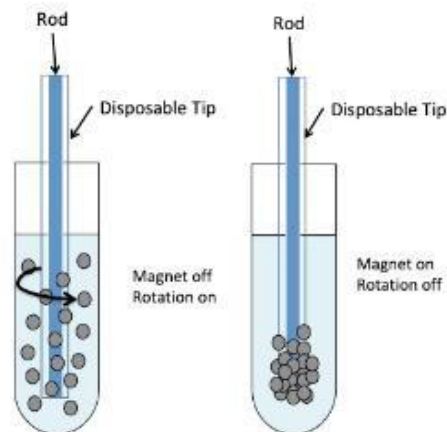


Figure 17: Principe de la technologie des "rod".

Les tiges sont plongées dans les échantillons avec des perles, la rotation est activée pour mettre ces perles en suspension. Ces dernières captent l'ADN durant la suspension. Une fois l'ADN attiré, la rotation est désactivée et la tige magnétique est activée pour attirer les perles.

- Technologie QuickGene, extraction réalisée par filtration sur membrane poreuse très mince (80µm). Cette technique repose sur la capacité d'une membrane à faire barrière entre deux milieux. Elle permet grâce à différentes forces motrices (chimique, physique ou électrostatique) de transférer certaines molécules. Dans ce cas présent, cette technique repose sur l'utilisation de résines échangeuses d'anions disposées sur des plaques de filtration (Figure 18).

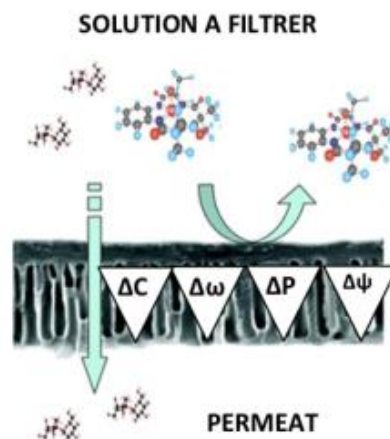


Figure 18 : Représentation schématique du principe de filtration membranaire avec ΔC (gradient de concentration), $\Delta \omega$ (gradient de potentiel chimique), ΔP (gradient de pression) et $\Delta \psi$ (gradient de potentiel électrostatique), les forces motrices du transfert à travers la membrane (LEITNER, 2013)

- Technologie utilisant la centrifugation pour extraire l'ADN. L'intérêt de cette technologie est l'utilisation de bras robotiques capables d'ouvrir et de fermer des tubes et également dans sa capacité à traiter simultanément 48 échantillons (Merel, 2007).

2.3.4.2 Modification du protocole :

Bronkhorst *et al.*, ont étudié l'influence que pouvait avoir la modification d'une étape de protocole (Bronkhorst *et al.*, 2015). Dans leur étude, différents critères ont ainsi été analysés (Figure 19) :

- Le choix de l'agent dénaturant : 3 protocoles ont été étudiés, dans lesquels un échantillon a été traité 30min à 50°C avant extraction de l'ADN circulant afin de déterminer quel était le meilleur agent dénaturant. Chaque protocole a été réalisé 4 fois.
 - le premier protocole a consisté à traiter l'échantillon avec du SDS (0,05%).
 - le deuxième protocole a été de traiter l'échantillon avec la protéinase K (1,5mg/ml). Dans le cas de ce protocole le tampon de liaison utilisé a été le NTI au lieu du NTB, tampon utilisé pour les deux autres protocoles.
 - Le troisième protocole a consisté à traiter l'échantillon avec les 2 agents dénaturants.

Les résultats ont démontré que l'utilisation de la protéinase K était la plus judicieuse pour avoir la meilleure concentration d'ADN tumoral circulant.

- L'effet de la combinaison congélation instantanée - protéinase K : pour ce critère, 4 protocoles ont été étudiés et chacun a été réalisé 2 fois :
 - L'ADN circulant est extrait directement après le prélèvement.
 - L'échantillon est traité avec la protéinase K directement après le prélèvement et l'ADN circulant est ensuite extrait.
 - L'échantillon subit directement une congélation rapide après le prélèvement et l'ADN circulant est extrait après la décongélation.
 - L'échantillon subit directement une congélation rapide après le prélèvement puis est décongelé pour être traité avec la protéinase K. L'ADN circulant est ensuite extrait.

Les résultats ont démontré que la congélation rapide n'influençait pas sur le taux d'ADN circulant retrouvé dans les échantillons traités avec la protéinase K.

- Le choix du tampon de liaison : 2 protocoles ont été étudiés pour déterminer quel était le meilleur tampon de liaison entre NTB et NTI. Le rapport échantillon tampon était de 1/5 et 1/2 respectivement. Après la décongélation de l'échantillon, celui-ci a été mélangé à un tampon de liaison avant d'être ajouté à la colonne de centrifugation. Chaque protocole a été réalisé 3 fois. Les résultats ont démontré que l'usage du NTB avait un rendement très légèrement supérieur à celui du NTI. Cependant, à cause de la difficulté de son utilisation, l'équipe de recherche a conclu qu'il était préférable d'utiliser le tampon de liaison NTI.
- Volume d'élution : une fois extrait, l'ADN circulant a été élué selon 4 protocoles : 20µl, 40µl, 60µl et 100µl de tampon d'élution respectivement. Chaque protocole a été réalisé 3 fois. Les résultats ont démontré que le volume d'élution le plus adapté pour une concentration d'ADN circulant optimale est de 60µl.

- Régime d'élution : après avoir déterminé le volume d'élution optimal, l'équipe de recherche s'est penchée sur le régime d'élution en testant 2 autres protocoles différents. Dans le premier, l'ADN circulant extrait a été initialement élué dans 20 μ l de tampon d'élution, cette étape a ensuite été répétée 2 fois de plus pour obtenir le volume final de 60 μ l. Dans le second protocole, l'ADN circulant extrait a été initialement élué dans 30 μ l de tampon d'élution, puis cette étape a été répétée une fois de plus. Ces 2 protocoles ont été réalisés 3 fois afin d'être comparés avec les résultats obtenus précédemment où l'ADN circulant extrait a été élué dans 60 μ l en une fois. Les résultats ont démontré qu'à chaque expérience, le régime d'élution optimal est 3 fois 20 μ l afin d'avoir la plus haute concentration d'ADN circulant.
- Le choix du type de tube d'élution utilisé : afin de déterminer quel tube permettait de perdre le moins d'ADN circulant, 2 tubes ont été étudiés, les tubes standard de 1,5ml (Eppendorf) et les tubes de 1,5ml LoBind tubes (Eppendorf). L'expérience a été réalisée 3 fois. Sur 2 des 3 études, les tubes standard permettaient d'obtenir la concentration d'ADN circulant la plus élevée.

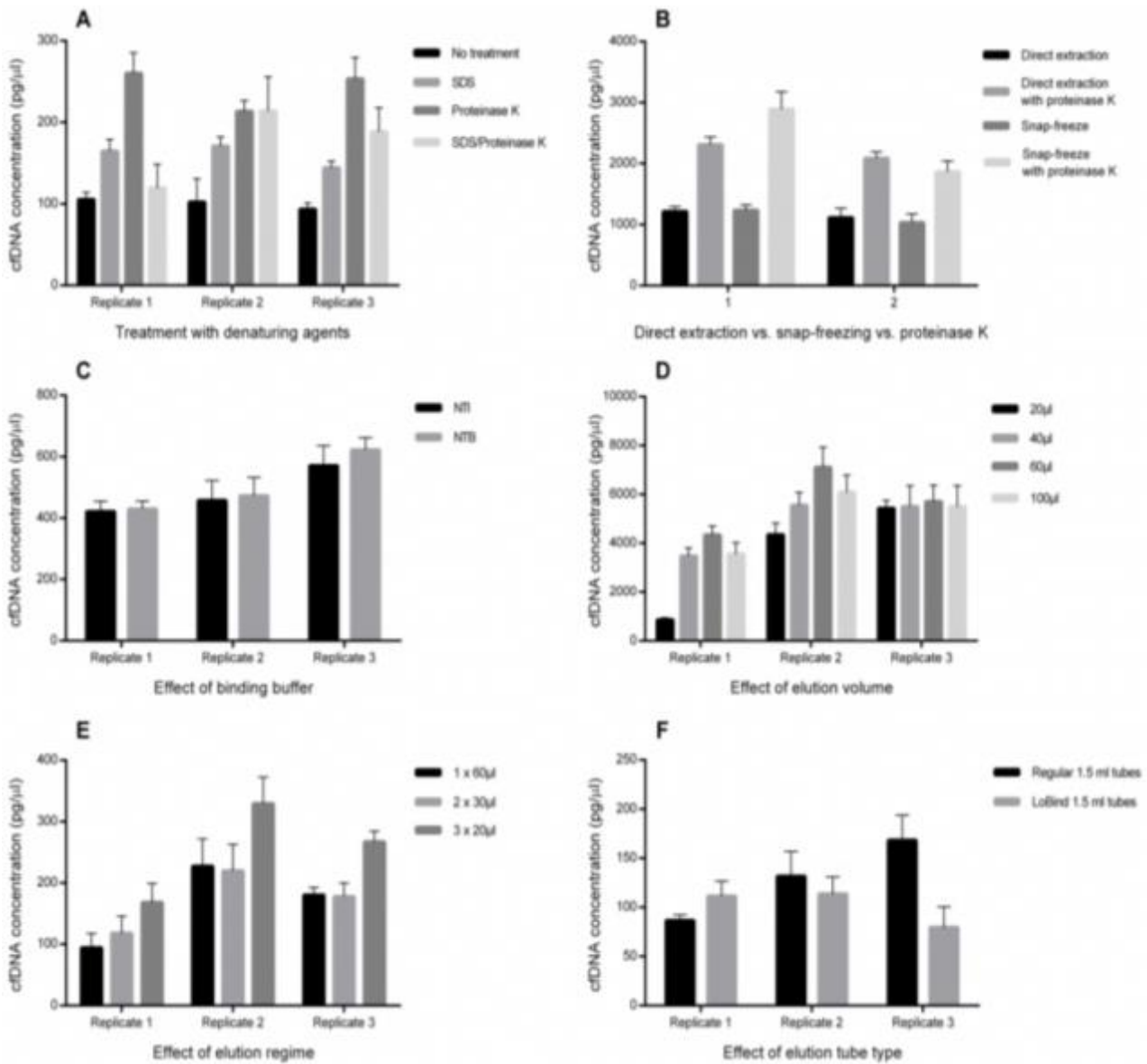


Figure 19: Effet des modifications du protocole d'extraction sur la concentration d'ADN circulant retrouvée (Bronkhorst et al., 2015).

2.3.4.3 Conditions de stockage

De nombreuses études se sont penchées sur les conditions de stockage des échantillons de plasma (Tableau 1).

Malgré l'hétérogénéité des conditions expérimentales de stockages des échantillons (température de congélation, délai de stockage et méthode de décongélation), il en ressort quelques généralités.

Tableau 1: Comparatif des conditions pré-analytiques et résultats de l'ADN circulant dans différentes études

Auteurs	Population clinique	Influence du délai de stockage	Influence de la température de stockage	Influence des cycles de congélation/décongélation
(El Messaoudi <i>et al.</i> , 2013).	2 sets : - ADN plasmatique de souris xénogreffées avec une lignée cellulaire humaine KRAS sauvage - ADN plasmatique humain présentant KRAS sauvage.	Echantillons étudiés à 40min, 3h, et 6h. Pas de différence statistiquement significative.	Etude à -80°C, -20°C, +4°C et température ambiante pendant 3h. Aucune différence statistiquement significative.	Etude après 1, 2 ou 3 cycles. Aucune différence statistiquement significative.
(Chan <i>et al.</i> , 2005)	Volontaires sains, ADN plasmatique séparé immédiatement le prélèvement.	Echantillons stockés : 2 semaines, 24h et 6h. Aucune différence statistiquement significative par rapport à l'analyse immédiate des échantillons.	Echantillons stockés : - A -80°C - A +4°C - A température ambiante. Aucune différence statistiquement significative par rapport à l'analyse immédiate des échantillons.	Etude après 1 ou 3 cycles. Aucune différence statistiquement significative avec l'analyse immédiate des échantillons.
(Holdenrieder <i>et al.</i> , 2010)	Patients atteints de divers cancers	1 ^{ère} analyse après 6 à 9 mois de congélation. Deuxième analyse 5 ans plus tard. Différence statistiquement significative.	Non étudiée. Echantillons stockés à -70°C.	Non étudié.
(Sozzi <i>et al.</i> , 2005).	Sujets provenant de 2 études : 1 : Patients atteints de cancer du poumon vs patients volontaires sains 2 : Patients volontaires gros fumeurs	Etude 1 : 1 ^{ère} analyse vers 9 mois et 2 ^{ème} vers 4 ans Etude 2 : 1 ^{ère} analyse vers 2 ans et 2 ^{ème} analyse vers 3 ans. Différence entre 1 ^{ère} et 2 ^{ème} analyse statistiquement différente dans les 2 groupes.	Non étudiée. Echantillons stockés à -20°C	Non étudié.

Il a ainsi été démontré qu'avant toute manipulation, une conservation des échantillons de plasma ou de sérum à -80°C ou $+4^{\circ}\text{C}$ n'altère pas l'intégrité de ces derniers (Figure 20 et Figure 21).

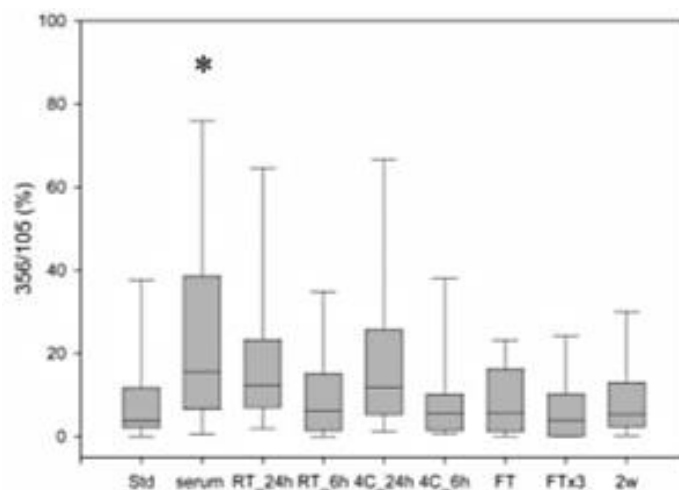


Figure 20 : Effets des conditions pré-analytiques sur l'ADN provenant de plasma et de sérum. (Chan et al., 2005). Chaque barre représente le ratio 356/105 paires de bases de l'ADN plasma/ADN sérum : la ligne du milieu de chaque boîte représente le 50^{ème} percentile, le haut et le bas des boîtes sont respectivement les 75^{ème} et les 25^{ème} percentiles. Les limites hautes et basses des barres représentent respectivement les 90^{ème} et les 10^{ème} percentiles.

Std : pour des échantillons de plasma analysés immédiatement après leur collecte; sérum sont les échantillons de sérum; RT_24h pour le plasma provenant d'échantillons sanguins stockés à température ambiante pendant 24h; RT_6h pour du plasma provenant d'échantillons sanguins stockés à température ambiante pendant 6h; 4C_24h pour du plasma prélevé sur les échantillons stockés 24h à $+4^{\circ}\text{C}$; 4C_6h pour du plasma prélevé sur des échantillons stockés 6h à $+4^{\circ}\text{C}$; FT pour les échantillons de plasma ayant subi un cycle de congélation/décongélation; FTx3 pour des échantillons de plasma ayant subi 3 cycles de congélation/décongélation; 2w pour les échantillons de plasma ayant été stockés 2 semaines à -80°C .

La seule condition pré-analytique présentant une différence significative par rapport au standard est sur la source d'ADN, en utilisant le sérum.

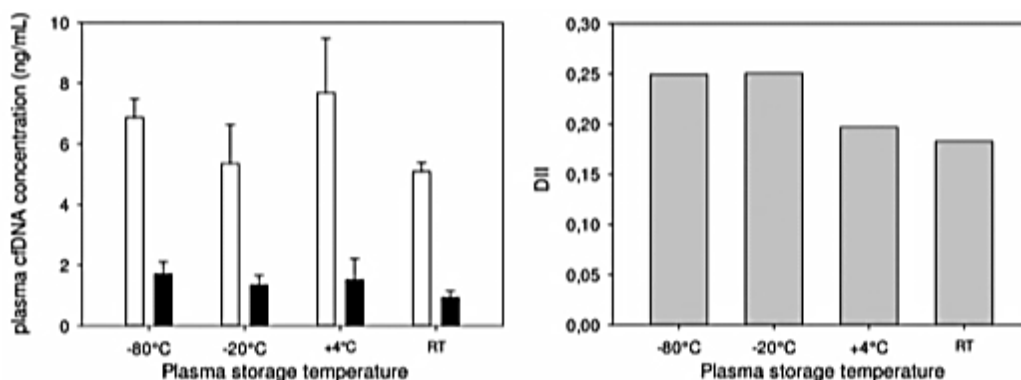


Figure 21 : Effets de différentes températures de stockage de l'ADN circulant. (El Messaoudi et al., 2013).

C : Comparaison des concentrations d'ADN tumoral circulant provenant d'échantillons plasmatiques après 3h de stockage à différentes températures. Les bâtons blancs correspondent aux échantillons provenant de souris xénotransgéniques avec une lignée cellulaire humaine KRAS sauvage et les bâtons noirs sont des échantillons humains présentant KRAS sauvage.

D : Comparaison de l'index d'intégrité (DII) des échantillons plasmatiques en fonction des différentes températures de stockage

L'effet de cycles consécutifs de congélation/décongélation ainsi que l'influence de la durée de conservation des échantillons congelés ont également été étudié. Il a été déterminé que, jusqu'au 3^{ème} cycle de congélation/décongélation, l'index d'intégrité de l'ADN était stable (Figure 22 et Figure 23) et qu'une conservation des échantillons d'ADN tumoral congelé pendant 9 mois avait peu d'influence sur la qualité des prélèvements (Figure 24).

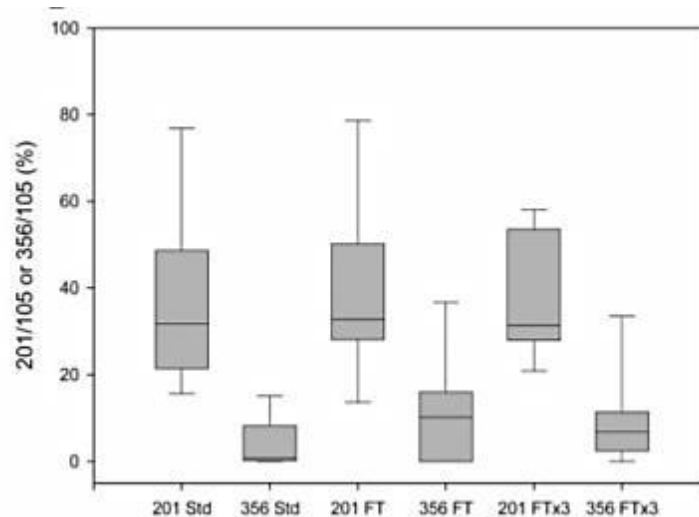


Figure 22: Effet du nombre de cycle de congélation/décongélation sur les ratios 201/105 paires de bases et 356/105 paires de bases (Chan et al., 2005). La ligne du milieu de chaque boîte représente le 50^{ème} percentile, le haut et le bas des boîtes sont respectivement les 75^{ème} et les 25^{ème} percentiles. Les limites hautes et basses des barres représentent respectivement les 90^{ème} et les 10^{ème} percentiles.

201 représentant les ratios entre la concentration d'ADN à 201 paires de bases par rapport à celle de 105 paires de bases; 356 étant le ratio de la concentration d'ADN de 356 paires de bases par rapport à celle de 105 paires de bases.

Il n'y a pas de différence significative observée par rapport au standard, quel que soit le nombre de cycles de congélation/décongélation.

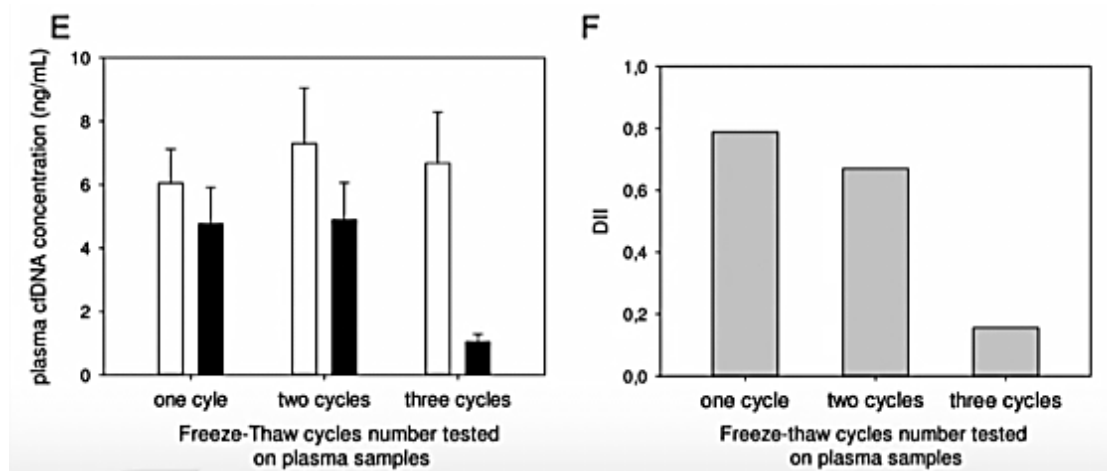


Figure 23: Comparaison de la concentration d'ADN tumoral circulant en fonction des cycles de congélation/décongélation avant extraction. (El Messaoudi et al., 2013).

E : Comparaison des concentrations d'ADN tumoral circulant après 1, 2 et 3 cycles de congélation/décongélation. Les bâtons blancs correspondent aux échantillons provenant de souris xénotransgéniques avec une lignée cellulaire humaine KRAS sauvage et les bâtons noirs sont des échantillons humains présentant KRAS sauvage.

F : comparaison de l'index d'intégrité de l'ADN en fonction du nombre de cycle de congélation/décongélation.

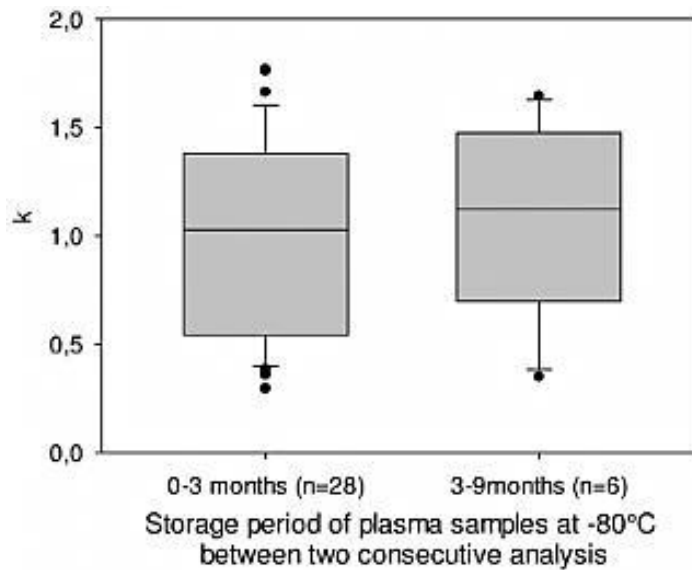


Figure 24 : Etude de l'influence de la durée de conservation des échantillons plasmatiques à -80°C en fonction de la variation de concentration de l'ADN circulant (k). (El Messaoudi et al., 2013).

La variation de concentration d'ADN circulant dans les échantillons entre 0-3 mois et 3-9 mois n'est pas statistiquement significative. On peut en conclure que la durée de conservation jusqu'à 9 mois n'a que peu d'incidence sur la concentration d'ADN circulant retrouvé dans les échantillons

2.3.5 Méthodes analytiques.

Ces dernières années, les connaissances relatives aux ADN circulant ont rapidement progressé grâce aux innovations technologiques. Dans cette partie, seront abordées les principales technologies de détection de l'ADN tumoral circulant.

2.3.5.1 Méthodes basées sur la PCR quantitative.

PCR en temps réel: quantité d'ADN circulant totale

La majorité des kits commercialisés pour la détection de mutations hotspot sélectionnées dans l'ADN tumoral circulant sont prévus pour l'analyse par PCR en temps réel.

La PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification (Figure 25). Ainsi, cycle après cycle, la quantité d'amplicons produits augmente, ce qui augmente proportionnellement, le signal fluorescent émis (Bustin, 2000).

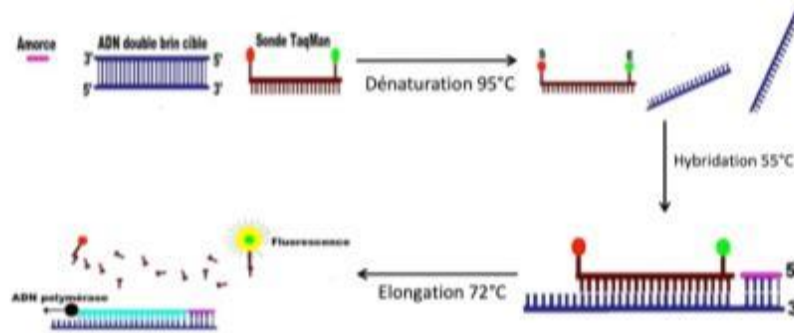


Figure 25: Principe de la PCR en temps réel grâce à une sonde TaqMan (Microbiologie Médicale, 2016)

ADN double brin et mélangé à des amorces et des sondes TaqMan avant d'être dénaturé à 95°C. Après la séparation des 2 brins, le mélange est abaissé à une température de 55°C pour que les sondes et les amorces puissent s'hybrider sur les brins d'ADN. Le mélange est ensuite monté en température à 72°C pour que des brins cibles puissent se faire afin de détecter leur présence par un signal fluorescent.

PCR spécifique d'allèle (AS-PCR).

La PCR spécifique d'allèle est une technique qui repose sur l'application de la PCR en permettant la détection directe de mutation ponctuelle. Cette méthode permet d'amplifier une séquence spécifique de l'ADN d'un gène en utilisant 2 couples d'amorces qui ne diffèrent que par une seule base. Ainsi la sonde normale reconnaît spécifiquement l'allèle normal et la sonde mutée l'allèle muté (Figure 26), ce qui permet d'isoler la mutation présente dans un échantillon sanguin. Il existe dans la littérature plusieurs acronymes pour décrire ce principe : ASPCR (Ugozzoli and Wallace, 1991), ARMS (Little, 2001) ou PASA (Bottema and Sommer, 1993).

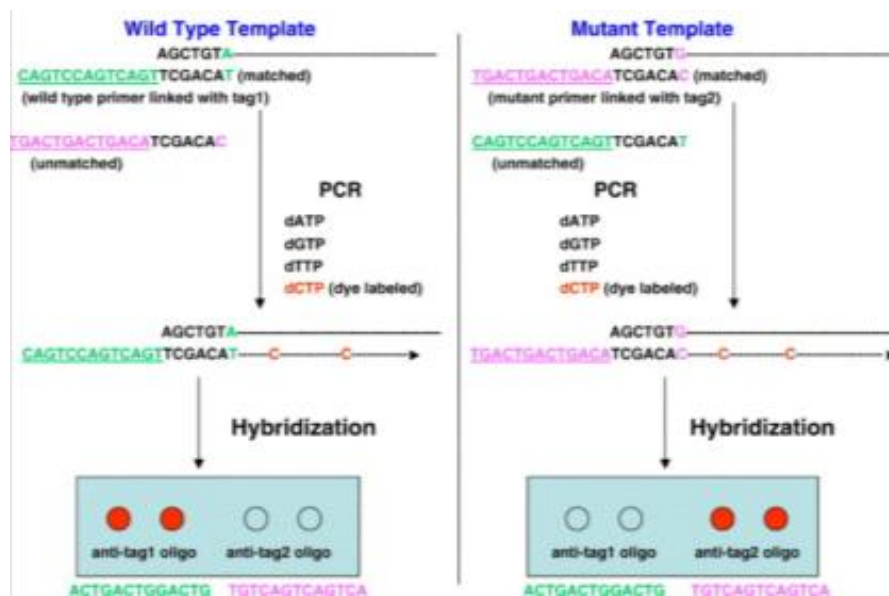


Figure 26 : Principe de la PCR allèle-spécifique (Tang et al., 2005).

2 amorces spécifiques sont utilisées, l'une spécifique de la séquence ADN non muté et l'autre spécifique de la séquence d'ADN muté.

A gauche : l'ADN de l'échantillon est normal, la sonde normale reconnaît l'allèle et l'amplifie spécifiquement.

A droite : l'ADN de l'échantillon est muté, la sonde mutée reconnaît l'allèle et l'amplifie spécifiquement.

Cold PCR.

La cold PCR repose sur l'observation que l'ADN double brin hétéroduplex (présentant des mésappariements) à une température d'hybridation plus basse que l'ADN double brin homoduplex (ADN complémentaire) (Mauger *et al.*, 2017). Cette différence de température de dénaturation étant connue et prévisible, il est possible de sélectionner spécifiquement la température de dénaturation de l'ADN double brin hétéroduplex : cette température est appelée température critique. Une fois que seul l'ADN double brin hétéroduplex est dénaturé, une PCR standard est effectuée avant qu'il soit analysé. 4 types de cold-PCR, différant quelque peu dans le protocole, sont possibles (Figure 27).

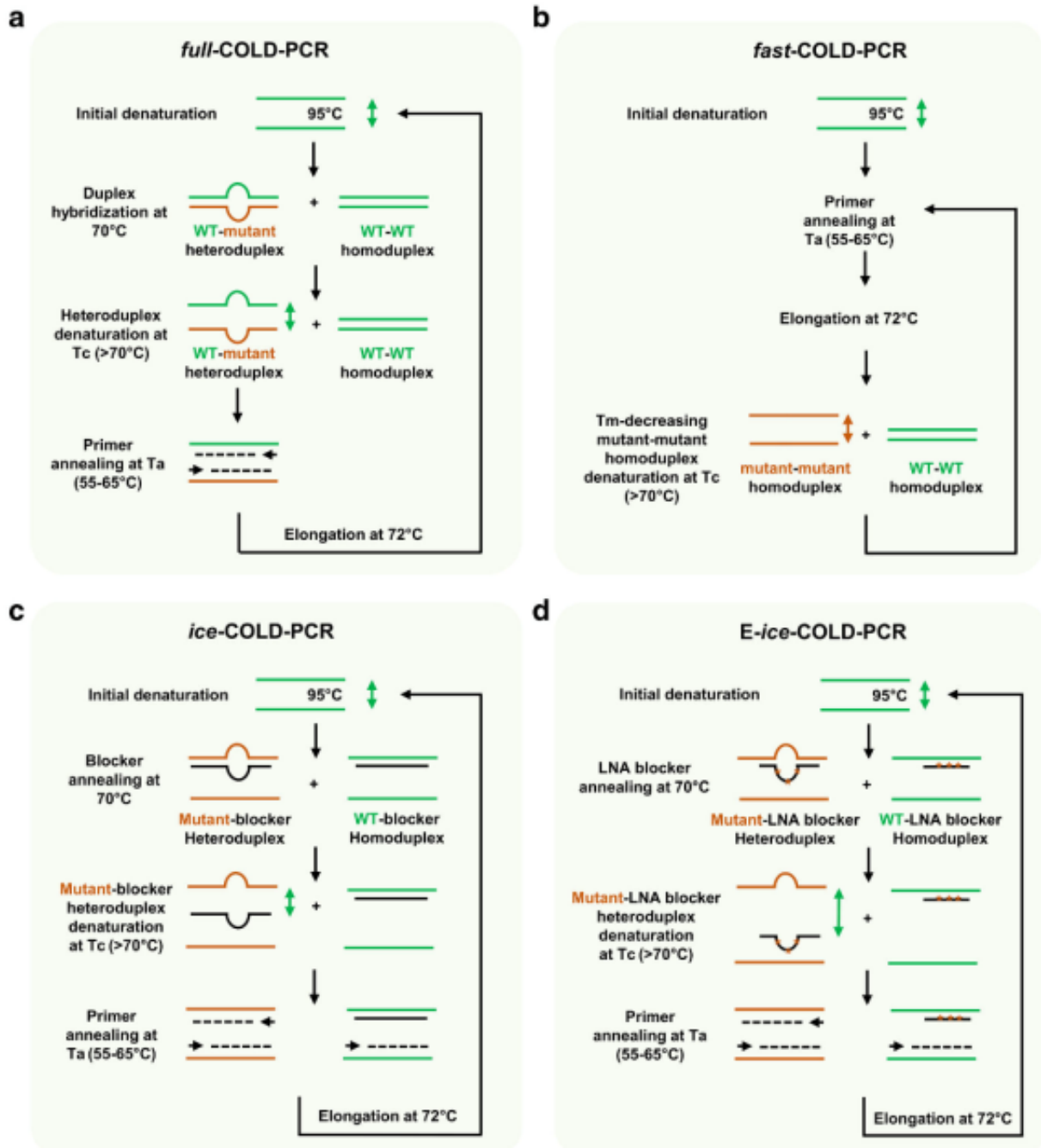


Figure 27: Les principes des différentes COLD-PCR possible pour l'analyse du génome (Mauger *et al.*, 2017).

Bi-PAP-A :

La méthode PAP a été développée pour détecter des mutations extrêmement rares dans des génomes complexes. Cette méthode repose sur le couplage d'une pyrophosphorolyse avec une ADN polymérase utilisant des primers PAP bloquant leur extrémité 3' (Figure 28). Le primer s'hybride avec l'ADN muté s'il y a une parfaite concordance, ce qui génère un signal fluorescent. Bi-PAP-A est une méthode PAP bidirectionnelle à amplification allèle spécifique : la PAP est réalisée simultanément dans les deux directions avec deux primers opposés qui se chevauchent sur un nucléotide à leurs extrémités 3'.

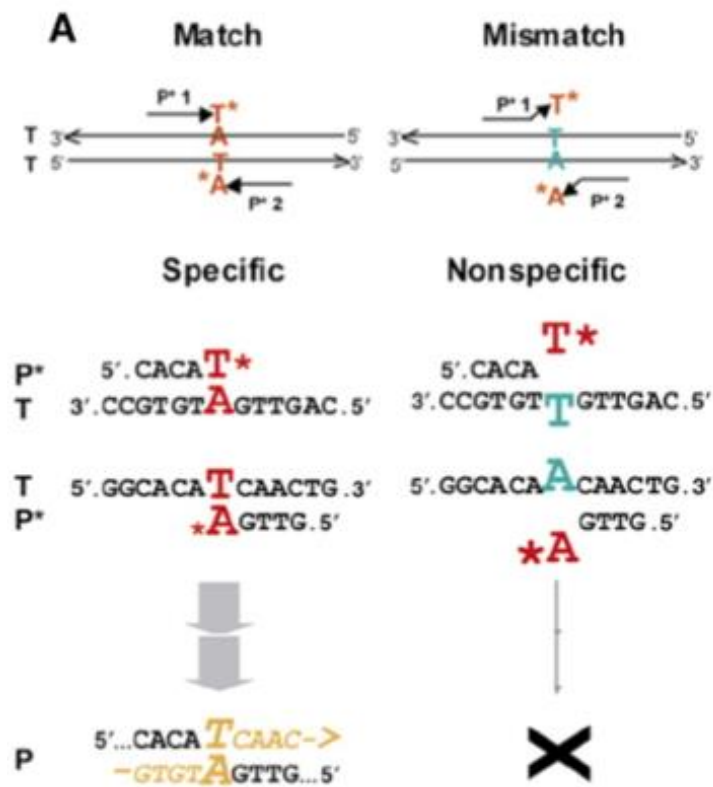


Figure 28: Principe de la méthode Bi-PAP-A (Liu and Sommer, 2004)

S'il y a une parfaite concordance entre les primers et la séquence d'ADN recherchée (mutée), l'amplification se produit, générant ainsi un signal fluorescent.

PCR Méthylation spécifique.

La PCR à méthylation spécifique est une méthode basée sur le traitement préalable de l'ADN au bisulfite (Figure 29). Ce traitement convertit les cytosines de l'ADN en uracile mais laisse les cytosines méthylées inchangées. Une PCR est ensuite réalisée avec des amorces qui distinguent les allèles méthylées des non-méthylées (Herman *et al.*, 1996).

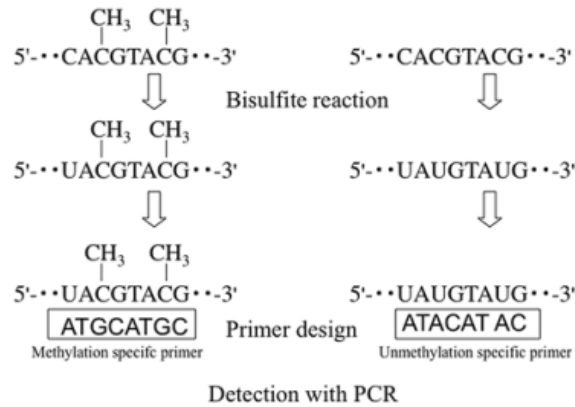


Figure 29: Principe de la PCR avec méthylation spécifique. (Muraki et al., 2009)
Après traitement de l'ADN par réaction au bisulfite, les cytosines non méthylées sont transformées en uracile. Des amorces, permettant de distinguer les allèles méthylées des allèles non-méthylées, sont ensuite utilisées pour la PCR.

Intplex®

La méthode Intplex® est basée sur la PCR-allèle spécifique combinée à des sondes bloqueuses. Les couples d'amorces pour la PCR ont pour objectif d'amplifier deux régions d'ADN (courtes et proches) dont l'une contient la mutation recherchée et l'autre la séquence sauvage (Figure 30). L'amplification est ensuite réalisée en utilisant une sonde bloquée qui s'hybride aux fragments d'ADN non mutés et une amorce spécifique à la séquence mutée d'intérêt dont la température de fusion est faible. Cette méthode permet de détecter des mutations dont la fréquence, pour les plus rares, est de 0,004 à 0,014% une détection (Thierry et al., 2014)

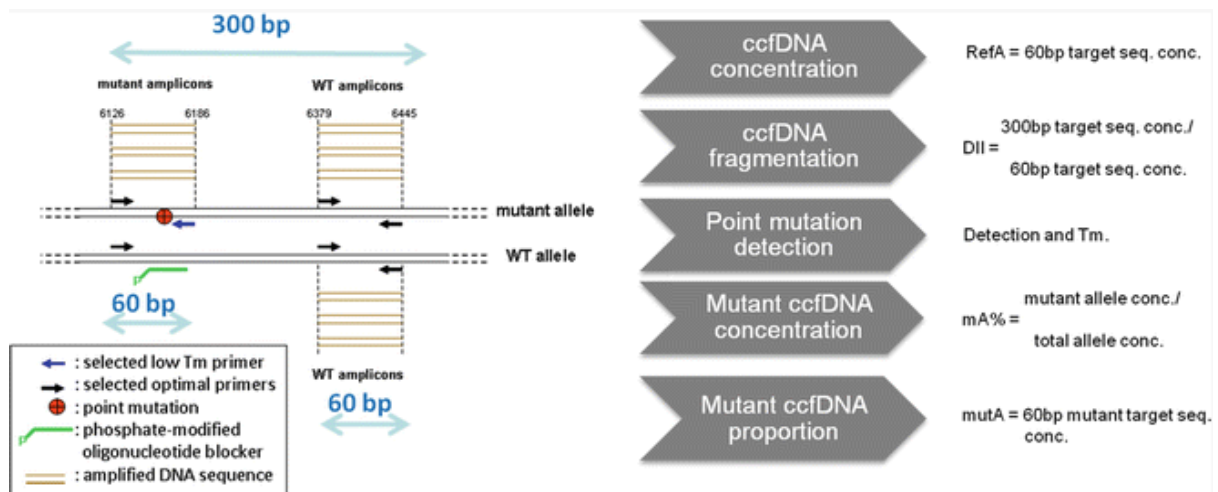


Figure 30: Schéma représentant la méthode Intplex®: PCR spécifique d'allèle optimisée (Didelot, 2017)

MassArray de Agena (MALDI-TOF)

MassArray est un système de détection ultrasensible multiplexé à un débit moyen basé sur MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/ionozation – Time to Flight) dont la limite de détection est de 0,1% (Figure 31). Grâce à ce système, il est ainsi possible de rechercher spécifiquement des SNP (single nucleotide polymorphism) sur plusieurs centaines/milliers

d'échantillons. La première étape consiste à la réalisation d'une PCR multiplexe sur les échantillons d'ADN à l'aide d'amorces spécifiques. Une déphosphorylation des dNTP et des amorces PCR non utilisées est ensuite réalisée avant d'effectuer une réaction iPLEX, qui est une extension d'un nucléotide des amorces. Les produits sont ensuite nettoyés des sels contaminants à la résine pour être transférés sur une micropuce en silicone à l'aide d'un nanodispenser. La masse des allèles de chaque SNP est déterminée par spectrométrie de masse sur le MALDI-TOF (Agena Bioscience GmbH).

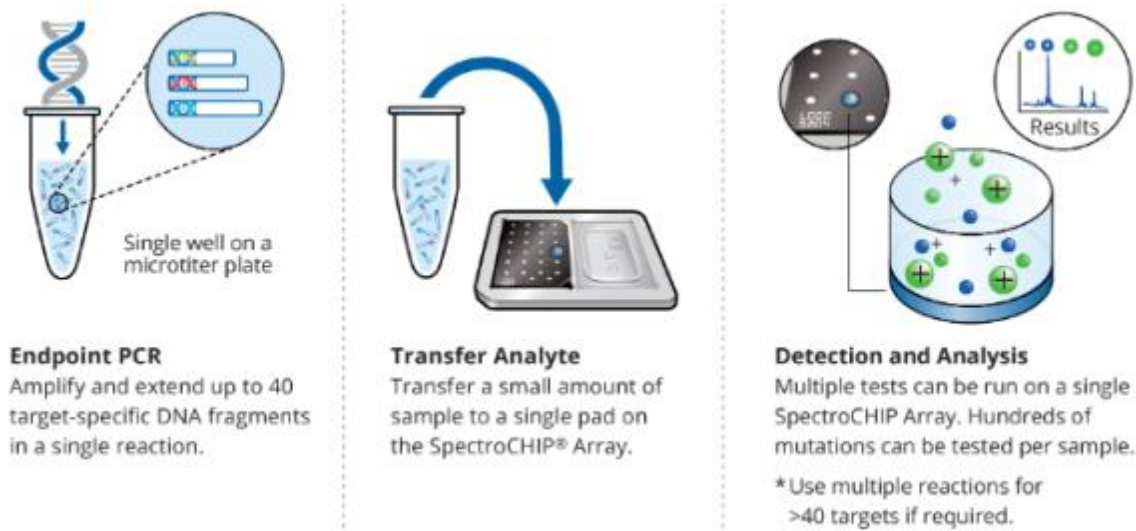


Figure 31: Principe de la méthode MassArray (Agena Bioscience GmbH)
La première étape est une PCR : 40 cibles spécifiques des fragments d'ADN sont amplifiés puis étendus dans une seule réaction (1) avant qu'une petite quantité ne soit transférée sur le tampon SpectroCHIP® Array. De multiples tests sont ensuite lancés où des centaines de mutations peuvent être testé par échantillons

2.3.5.2 Méthodes basées sur la PCR digitale.

PCR Digitale en microgouttelettes à haut débit (ddPCR).

La ddPCR (droplet digital PCR) est basée sur le fractionnement des échantillons en 20 000 gouttelettes par émulsion eau-huile, chaque fragment est ensuite amplifié par PCR (Figure 32). Le nombre de copies par microlitre d'échantillon est calculé en s'appuyant sur la loi statistique de Poisson : le nombre important de gouttelettes et la probabilité faible de trouver une mutation. Cette ddPCR permet le traitement d'environ 2 millions de micro réactions de PCR. La quantification absolue étant l'un des avantages de cette technique, il n'est plus nécessaire d'établir une courbe standard. De plus, la ddPCR permet la détection de mutations présentes en très faibles fréquences alléliques avec un seuil de détection de mutation de 0,001% (Hindson et al., 2011; Taly et al., 2013).

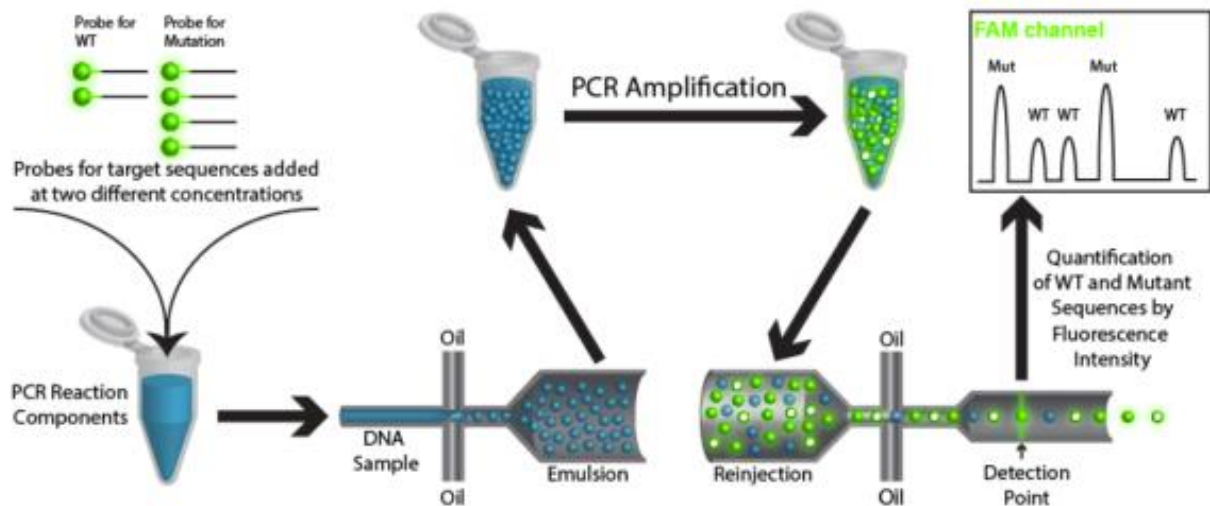


Figure 32 : Principe de la ddPCR (Riout, 2016).

L'échantillon est préparé pour l'amplification (primers, sondes et master mix) puis grâce à une émulsion eau-huile, l'échantillon est fractionné en 20 000 gouttelettes. Le nombre de copies d'ADN présent dans chaque gouttelette est ensuite amplifié par PCR. Chaque gouttelette est ensuite analysée grâce à un système de détection à 2 couleurs pour différencier les gouttelettes positives (celle contenant la mutation recherchée) des gouttelettes négatives.

BEAMing :

La méthode BEAMing (pour Beads, Emulsion, Amplification, Magnetics) combine une PCR et une cytométrie en flux pour identifier et quantifier les mutations somatiques présentes dans l'ADN (Figure 33). La méthode BEAMing commence par l'isolation de l'ADN présent dans l'échantillon, suivi d'une étape de pré-amplification par PCR en utilisant des amorces à séquences connues. Les séquences amplifiées sont ensuite liées à des billes magnétiques puis compartimentées en microgouttelettes dans une émulsion eau-huile. Dans chaque microgouttelette, une réaction PCR est effectuée pour amplifier les séquences d'intérêt. Ces billes sont ensuite récupérées durant l'étape de purification à l'aide d'un aimant avant d'être incubées dans une solution contenant des marqueurs fluorescents. Les séquences d'ADN ainsi marquées sont ensuite analysées en cytométrie de flux.

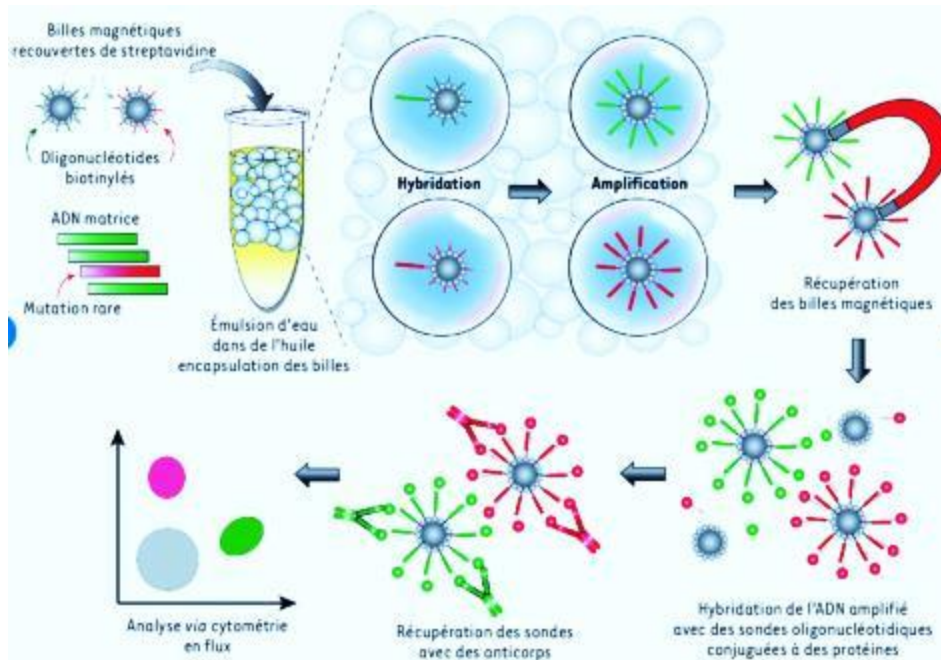


Figure 33: Principe de la procédure BEAMing. (Caen et al., 2015)

2.3.5.3 Méthodes basées sur la technique NGS.

Séquençage à haut débit.

Le séquençage haut débit est une méthode apparue ces dernières années permettant d'analyser simultanément de nombreux *loci* et de séquencer entièrement l'ADN circulant (Figure 34).

- La première étape de cette méthode est la préparation des bibliothèques, qui consiste généralement en la fragmentation de l'ADN et sa liaison avec de petites séquences spécifiques. Cependant l'ADN tumoral circulant étant déjà de petite taille, la fragmentation n'est pas nécessaire.
- la deuxième est l'amplification clonale de la bibliothèque.
- la troisième et dernière étape est le séquençage. La technologie Illumina® est la plus utilisée pour le séquençage. Cette technologie est dite par synthèse, c'est-à-dire qu'elle identifie la séquence lors de l'incorporation des nucléotides pendant le séquençage. Lors de leur incorporation, les bases émettent un signal fluorescent ce qui permet de déterminer la séquence d'ADN.

Deux approches de séquençage du génome sont possibles : le séquençage entier ou le séquençage ciblé. La limite de détection de cette technologie est de l'ordre de 0,001% à 2% (Cai et al., 2015).

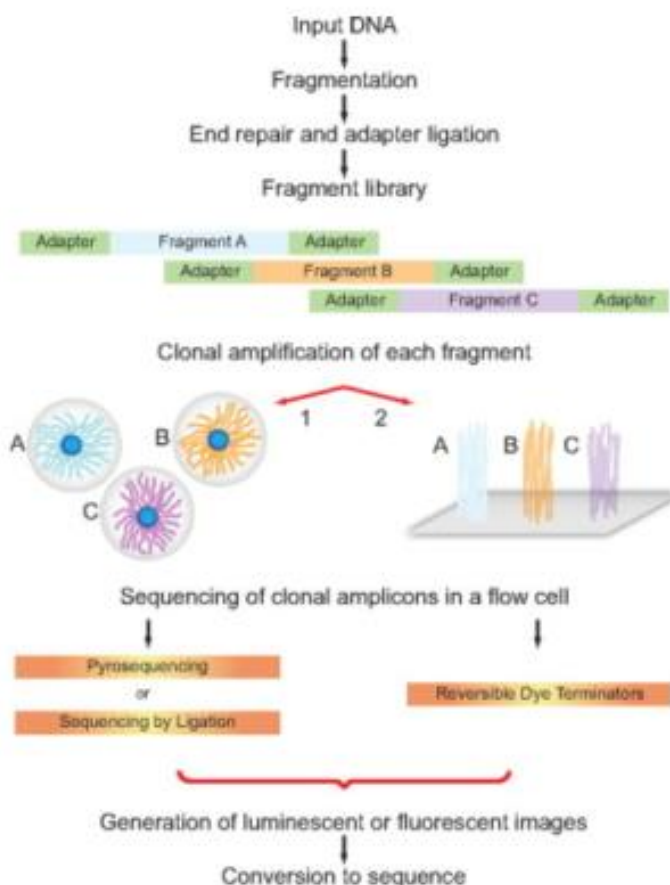


Figure 34: Principe général du séquençage à haut débit (Voelkerding et al., 2010).

L'échantillon d'ADN subit une fragmentation avant d'être amplifié. Le séquençage peut ensuite avoir lieu, en utilisant différentes techniques, ce qui génère un signal fluorescent convertible en séquence d'ADN.

Séquençage ciblé du génome :

Le séquençage ciblé est souvent utilisé pour séquencer un panel de gènes associés, dans notre cas, des gènes présentant fréquemment des mutations dans un contexte de maladie cancéreuse. Deux approches existent :

- approches par capture: les séquences cibles sont capturées par hybridation sur des sondes spécifiques.
 - CAPP-seq (Newman et al., 2014) : cette méthode combine la capture par affinité hybride de centaines de régions génomiques avec un séquençage en profondeur et un flux de travail spécialisé en bioinformatique. Cela permet d'introduire le profilage personnalisé du cancer par le séquençage en profondeur. Newman et al. ont mis en évidence l'utilité de cette méthode en analysant les patients atteints d'un cancer bronchique du poumon de stade II à IV. Dans cette étude, les mutations ont été détectées dans plus de 95% avec des fractions d'allèles mutants jusqu'à 0,02%.

- CAPP-seq couplée à iDES (Newman *et al.*, 2016): différents facteurs influencent les limites de détection de l'ADN tumoral circulant, mais la récupération des molécules d'ADN tumoral circulant et les erreurs non biologiques introduites lors de la préparation et du séquençage de la librairie continuent de représenter un obstacle majeur au profilage. Pour surmonter les limitations de cette approche, Newman *et al.* ont introduit la notion de suppression d'erreur numérique intégrée (iDES). Cette méthode combine l'élimination d'artéfacts dans les données de séquençage à une stratégie de codage à barres moléculaires, ce qui permet de maximiser la récupération des molécules d'ADN libre circulant. Individuellement ces méthodes améliorent 3 fois la sensibilité de CAPP-Seq, mais combinées, ces méthodes l'améliorent d'environ 15 fois. Newman *et al.* ont ainsi démontré que la sensibilité et la spécificité de cette méthode étaient respectivement de 92% et 96%, même chez les patients atteints de cancers du poumon de stade I.
- approches par amplicons : les fragments d'ADN d'intérêt sont amplifiés par PCR à l'aide d'amorces.
 - Safe-Sequencing (Kinde *et al.*, 2011): chaque molécule modèle de la mutation recherchée a un identifiant unique d'attribué avant d'être amplifiée de manière spécifique. Les fragments sont considérés comme mutants si plus de 95% d'entre eux contiennent la même mutation.
 - SiMsen-seq (Ståhlberg *et al.*, 2016) : chaque molécule d'ADN d'intérêt porte un code barre avec une séquence unique et où les banques sont en forme de code-barre. Ce protocole comprend 3 cycles de PCR par code barre et une PCR avec adaptateur avant d'être purifié pour le séquençage. Ainsi, cette méthode permet de détecter des variants dont la fréquence est <0,1%.
 - BPER (Pécuchet *et al.*, 2016) : méthode statistique basée sur la quantification du taux d'erreur de position (PER). Le taux de PER a été quantifié à chaque position de base indépendamment chez des personnes saines. Pour chaque position, Pécuchet *et al.* ont vérifié si la fréquence d'allèle mineur (FA) était significativement supérieure à celle du PER afin de détecter les vraies mutations. Ainsi, la méthode BPER a permis de détecter des mutations avec une FA de 0,003% pour le SNV et 0,001% pour les insertions et délétions de plus de 2pb dans l'ADN plasmatique de patients atteints de cancer du poumon ou du pancréas.

3. Applications cliniques de l'ADN tumoral circulant.

3.1. Marqueur théranostique.

L'une des premières applications cliniques envisagée de l'ADN tumoral circulant a été son utilisation comme marqueur théranostique pouvant remplacer la biopsie tissulaire. Dans ce but, de nombreuses études ont démontré la concordance d'une détection de mutations sur l'ADN tumoral circulant et sur le prélèvement tissulaire, tous cancers confondus.

Dans l'adénocarcinome pulmonaire, la recherche des nombreuses mutations à visée thérapeutique est un standard incontournable dans la prise en charge des patients, où l'ADN tumoral circulant représente une alternative intéressante. L'étude réalisée par Newman *et al.* a démontré que les mutations des gènes *EGFR* et *KRAS* étaient détectées chez 13 patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire nouvellement diagnostiqués et tous stades confondus, avec une spécificité de 96% par méthode CAPP-Seq (Newman *et al.*, 2014).

La détection de plusieurs mutations est essentielle pour adapter le traitement des patients atteints d'un adénocarcinome pulmonaire. Couraud *et al.* ont ainsi étudié la capacité de détecter diverses mutations connues de l'adénocarcinome non traité (*EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *ERBB2*, et *PI3KCA*) chez 107 patients non-fumeurs en utilisant l'ADN tumoral circulant (Couraud *et al.*, 2014). Les résultats de la biopsie liquide comparés à ceux de la biopsie tissulaire ont démontré que l'analyse de l'ADN tumoral circulant avait une spécificité, toutes mutations confondues, de 87% (62 %-96 %) et une sensibilité de 58 % (43 %-71 %)

Marchetti *et al.* ont étudié la concordance des mutations du gène *EGFR* par séquençage de nouvelle génération (NGS) sur l'ADN tumoral circulant par rapport aux résultats de la biopsie tissulaire (Marchetti *et al.*, 2015). L'étude a été menée sur 69 patients atteints de cancers non à petites cellules du poumon présentant la mutation *EGFR* et 21 patients sans cette mutation. Les résultats mettent en évidence une spécificité et une sensibilité de 74% et 100%.

La mutation *PI3K* étant retrouvée dans 20 à 30% des cancers du sein (Yip *et al.*, 2010), différentes études ont étudié la capacité de l'ADN tumoral circulant à détecter cette mutation. Ainsi Board et son équipe ont, avec la méthode analytique ARMS, analysé les échantillons plasmatiques de 46 patients atteints de cancer du sein métastatique; ces résultats ont ensuite été comparés à ceux obtenus à partir de la biopsie tissulaire (Board *et al.*, 2010). Il a été démontré que la concordance du statut mutationnel entre les échantillons plasmatiques et les échantillons tissulaires provenant des patients atteints de cancer du sein métastatique était de 95%.

Higgins et son équipe (Higgins *et al.*, 2012) ont, quant à eux, réalisé en premier lieu une étude rétrospective sur 49 patients atteint de cancer du sein dont le statut mutationnel de *PIK3CA* avait été déterminé par biopsie tissulaire. Les échantillons sanguins prélevés chez

ces patients ont été analysés par méthode BEAMing, et la concordance des résultats était de 100%. Dans un second temps, Higgins *et al.* ont réalisé une étude prospective sur 60 patients atteints de cancer du sein métastatique en recherchant la mutation *PIK3CA* dans l'ADN tumoral circulant. Les résultats obtenus ont ensuite été comparés au statut mutationnel des patients, déterminé par BEAMing et/ou séquençage à partir de la biopsie tissulaire. Pour cette étude, il en ressort que la concordance ADN tumoral circulant/BEAMing de biopsie tissulaire est de 72,5% alors que la concordance ADN tumoral circulant/séquençage de biopsie tissulaire est de 100%.

La connaissance du statut mutationnel RAS est nécessaire pour l'indication des thérapies ciblées. Par conséquent, Thierry et son équipe (*Thierry et al., 2014*) ont étudié la faculté à déterminer le statut mutationnel des gènes *KRAS* et *BRAF* à partir de l'ADN tumoral circulant, en comparant les résultats obtenus via l'analyse des biopsies tissulaires. En étudiant ainsi le statut de 106 patients atteints de cancer colorectal métastatique, l'équipe a démontré une sensibilité et une spécificité de l'ADN tumoral circulant de 100% en ce qui concerne la mutation V600E. En ce qui concerne la mutation du gène *KRAS*, il a été démontré une spécificité et une sensibilité de 98% et de 96%, respectivement

Dans la même optique, l'étude menée par Bachet *et al* a comparé la capacité de détection du statut RAS par l'ADN tumoral circulant et les échantillons tumoraux (Bachet et al., 2018a). Dans cette étude, des échantillons de plasma ont été collectés de manière prospective chez patients atteints de cancer colorectal n'ayant pas encore été traités afin d'être analysés de manière centralisée par technique NGS. Les échantillons de biopsie ont quant à eux été analysés de manière locale pour déterminer le statut RAS. La concordance des résultats, entre les échantillons plasmatiques et tissulaire, s'est avérée de 89% tous patients confondus et de 93,5% dans le sous-groupe des patients présentant des métastases hépatique. La sensibilité et la spécificité de la technique NGS était respectivement de 76% et 98,2%. L'analyse des échantillons plasmatiques par ddPCR par méthylation spécifique a permis de réduire de manière significative les faux négatifs avec une sensibilité atteignant 93%.

OncoBEAM (Harle et al., 2019) est une étude réalisée sur 202 échantillons qui compare la capacité de détecter les mutations *BRAF*, *KRAS* et *NRAS* dans l'ADN tumoral circulant et dans les échantillons provenant de biopsies tissulaires par BEAMing

A travers ces études (Tableau II), il a été mis en évidence que l'ADN tumoral circulant pouvait être tout aussi sensible et spécifique que les biopsies tissulaires tout en présentant des avantages non négligeables.

Tableau II: Récapitulatif des études démontrant la concordance entre la détection de marqueur théranostique par biopsie tissulaire et ADN tumoral circulant

Auteurs	Nombre patients inclus	Type de cancers	Mutations recherchées	Méthode utilisée	Spécificité (%)	Sensibilité (%)
(Newman et al., 2014)	18	Adénocarcinome pulmonaire	EGFR KRAS	CAPP-Seq	96	Stades I-IV: 85 stades II-IV : 100
(Couraud et al., 2014)	107	Adénocarcinome pulmonaire	EGFR ; KRAS ; BRAF ; ERBB2 ; PI3KCA	PCR multiplex	87	58
(Marchetti et al., 2015)	90	Cancer bronchique non à petites cellules	EGFR	NGS	74	100
(Board et al., 2010)	46	Cancer du sein	PI3K	ARMS	95	80
(Higgins et al., 2012)	49 60	Cancer du sein Cancer du sein métastatique	PIK3CA	BEAMing BEAMing et/ou séquençage	100 72,5 100	95
(Thierry et al., 2014)	106	Cancer colorectal métastatique	BRAF ^{V600E} KRAS	PCR	100 98	100 96
(Bachet et al., 2018a)	412	Cancer colorectal	RAS	NGS ddPCR par méthylation	98,2	76 93
(Harle et al., 2019)	236	Cancer colorectal métastatique	KRAS ; NRAS ; BRAF	BEAMing	94,3	65,1

En effet, diverses études ont démontré que la biopsie tissulaire ne contenait pas nécessairement toutes les caractéristiques d'un cancer qu'il est pourtant nécessaire de déterminer afin d'ajuster au mieux le traitement (De Mattos-Arruda *et al.*, 2014a; Shah *et al.*, 2012; Swanton, 2012).

Or, Vasioukhin *et al.* (Vasioukhin Valeri *et al.*, 1994) ont étudié la moelle osseuse, les cellules sanguines et le plasma de 5 patients atteints de leucémie aiguë myéloïde ou de syndrome myélodysplasique à la recherche de certaines mutations spécifiques. Celles-ci étaient toujours détectées dans l'ADN plasmatique alors qu'elles étaient parfois absentes dans l'ADN des cellules sanguines ou dans la moelle osseuse. Ces résultats ont ainsi mis en évidence qu'une biopsie de la moelle osseuse ne contenait pas forcément toutes les mutations impliquées dans le cancer.

Plus récemment, Bashashati et son équipe ont mesuré le degré de diversité génomique d'un cancer haut gradé des ovaires non traité de 6 patientes (Bashashati *et al.*, 2013). Pour cela, ils ont réalisé entre 3 et 10 échantillons chez ces volontaires, espacés dans le temps (au début de l'étude et 42 mois plus tard) et dans l'espace (masses ovariennes, métastases distantes et lésions sur les trompes de Fallope). Ils ont ensuite réalisé plusieurs profilages d'expression des gènes sur ces échantillons, qui ont permis de mettre en évidence qu'il

existait des variations intra-tumorales de mutations, de copies de gènes et du profil d'expression de ceux-ci ; en effet, certaines mutations n'étaient présentes que sur certains échantillons (*PIK3CA*, *CTNNB1*, *NF1*). Seuls 51,5% des mutations étaient présentes dans tous les échantillons, dont *TP53*.

Ces résultats ont été constatés dans le cas du cancer pancréatique métastatique (Yachida *et al.*, 2010) où les mutations ont été catégorisées en 2 types : celles présentes dans tous les échantillons provenant d'un même patient, quels que soient les sites de prélèvements. Ces mutations représentent 48 à 83% de toutes les mutations détectées, tumeur primitive ou métastases. Les autres mutations détectées, de l'ordre de 17 à 52%, sont des mutations caractérisées comme "progressives". Elles ont été retrouvées uniquement dans les métastases. Cependant, des analyses plus poussées ont mis en évidence que l'hétérogénéité tumorale était déjà existante dans les tumeurs primitives et que ces dernières sont, en réalité, un mélange de plusieurs sous-clones répartis de manière aléatoire.

Litchfield *et al.*, ont récemment publié sur une nouvelle méthode permettant la détection et l'analyse de toute l'hétérogénéité tumorale : Representative Sequencing (Rep—Seq) (Litchfield *et al.*, 2018). Ce protocole a pour principe d'analyser tout le matériel tumoral résiduel présent dans un échantillon puis de le coupler à du NGS. La preuve de concept de ce protocole a été réalisée sur 13 cancers et a démontré sa capacité à détecter 4 fois plus de mutations par rapport à un séquençage dit « classique ».

En plus de l'hétérogénéité intra-tumorale et spatiale, les biopsies tissulaires ne sont, dans certains cancers et/ou réalisées de façon répétée chez un même patient, pas toujours techniquement possibles et ne sont pas sans risque (Bosc *et al.*, 2015; Tsui and Berger, 2016; Wyatt *et al.*, 2018). Ces limites ne sont pas applicables à la biopsie liquide puisque les prélèvements sanguins sont des actes peu invasifs, ce qui confère un réel avantage à cette technique d'analyse.

Enfin, obtenir des résultats rapides est un facteur essentiel, notamment pour les patients atteints d'un cancer de stade avancé ou pour ceux atteints d'un cancer à croissance rapide. D'un point de vue pratique, l'utilisation de l'ADN tumoral circulant permet une réduction du temps d'analyse : lors d'une biopsie tissulaire, un certain temps est requis pour la prise en charge du prélèvement (fixation au formol, inclusion en paraffine, préparation des lames...) qui n'est pas nécessaire lors de l'utilisation d'un prélèvement sanguin. Ainsi, alors qu'il faut une dizaine de jours pour avoir les résultats par biopsie tissulaire, il a été estimé qu'une à deux journées suffisent pour obtenir les mêmes par biopsie liquide en utilisant des techniques de PCR temps-réel et trois à cinq jours en utilisant le NGS (Heitzer *et al.*, 2013b; Thierry *et al.*, 2017).

3.2. Monitoring.

L'objectif de diagnostiquer une rechute précoce, alors que la progression de la tumeur est encore faible, peut permettre un ajustement rapide de la stratégie de traitement choisie (Haber and Velculescu, 2014). Il s'est avéré intéressant d'exploiter la demi-vie relativement courte de l'ADN tumoral circulant qui permet ainsi de suivre quasiment en temps réel l'évolution de la tumeur et l'efficacité d'un traitement. Plusieurs études, menées sur des patients atteints de divers cancers, ont ainsi démontré que la concentration d'ADN circulant reflétait de façon proportionnelle la charge tumorale et le risque de récurrence

- Dans le mélanome, Tsao *et al.*, ont quantifié l'ADN tumoral circulant de 6 patients tout au long de leur traitement (Chang-Hao Tsao *et al.*, 2015). Avant l'initiation du traitement, tous ces patients avaient un taux d'ADN tumoral circulant détectable dans leurs échantillons plasmatiques. Les modifications dynamiques de l'ADN tumoral circulant observées dans les échantillons prélevés tout au long de leurs traitements correspondaient à leur statut pathologique : lors de la réponse au traitement le taux d'ADN tumoral circulant chutait et lorsqu'il augmentait, une progression détectable de la maladie était observée.

Sanmed *et al.* ont quantifié cette même réponse chez 20 patients atteints de mélanome avancé avec une mutations BRAF^{V600E} (Sanmamed *et al.*, 2015). Les échantillons ont été prélevés avant l'initiation d'une nouvelle ligne de traitement, avant le début du deuxième cycle de ce traitement, au moment où il été constaté une réponse à l'imagerie et/ou au moment où il était constaté une progression de la maladie. Les échantillons prélevés avant l'initiation de traitement ont été comparés avec les résultats de la biopsie, réalisée au même moment, pour constater la concordance des résultats. Les échantillons prélevés avant l'initiation du second cycle de traitement ont mis en évidence une chute drastique de l'ADN tumoral circulant, passant d'une moyenne de 216 copies/ml avant le traitement à 0 copie/ml. Cette quantité de copie d'ADN tumorale circulant a été également observée dans les échantillons prélevés au moment où il était constaté, à l'imagerie, une réponse optimale au traitement. Lors du diagnostic d'une progression de la maladie chez les patients, les échantillons plasmatiques ont mis en évidence une augmentation de la quantité d'ADN tumoral circulant à 115 copies/ml. L'équipe de Sanmed a également démontré qu'une faible concentration d'ADN tumoral circulant était associé à une survie globale et une survie sans progression de 27,7 mois et 9 mois respectivement alors que des concentrations élevées ont une survie globale et une survie sans progression de 8,6 et 3 mois, respectivement.

- En ce qui concerne le carcinome lobulaire, l'équipe de De Mattos-Arruda a étudié l'évolution de l'ADN tumoral circulant chez une patiente présentant ce cancer avec des métastases, présentes sur le foie et les os, et diagnostiquées comme ER+/HER2

- (De Mattos-Arruda *et al.*, 2014b). Ainsi, de multiples échantillons sanguins ont été prélevés durant la 4^{ème} ligne de traitement de cette patiente. Ces prélèvements ont montré une variation de la quantité d'ADN tumoral circulant, qui reflétait la réponse au traitement évaluée par tomodensitométrie ;
- Le même objectif a été étudié chez des patients atteints de cancers colorectaux : Reinert *et al.*, ont analysé les échantillons plasmatiques de 11 patients au jour 0 (pré opératoire), 8 jours après, 30 jours après et ensuite tous les 3 mois jusqu'au 36^{ème} mois de suivi, au décès du patient ou au retrait de consentement (Reinert *et al.*, 2016). Parmi ces 11 patients traités initialement par une chirurgie à visée curative, six d'entre eux ont eu une rechute de la maladie et les cinq autres n'ont pas eu de progression cliniquement constatée. L'analyse de l'ADN tumoral circulant des échantillons plasmatiques réalisée en préopératoire a montré une correspondance avec les résultats de la biopsie tissulaire, réalisée au même moment, chez 100% de ces patients. Les variations constatées dans les échantillons réalisés aux différents points de suivi correspondaient à l'évolution de la maladie chez tous les patients : chute drastique en post-chirurgicale puis augmentation rapide significative chez les patients ayant été diagnostiqués comme étant en récurrence. Pour ces patients ayant présenté une rechute, la quantification de l'ADN tumoral circulant a permis de poser ce diagnostic de récurrence en moyenne 10 mois avant que cette progression ne soit visible en imagerie.
 - Tie *et al.* ont, quant à eux, étudié l'évolution de l'ADN tumoral circulant lors de l'administration d'une première ligne de traitement (Tie *et al.*, 2015). Cinquante-trois patients ont ainsi eu des prélèvements sanguins réalisés 7 jours avant le traitement, 3 jours après et avant l'initiation du 2^{ème} cycle. Des scanners tomodensitométriques ont également été réalisés avant le traitement et 8-10 semaines après pour être ensuite évalués selon les critères RECIST. Les résultats ont démontré la supériorité de l'ADN tumoral circulant à détecter les mutations face à la biopsie tissulaire, puisqu'une ou plusieurs mutations ont été détectées chez 52 et 48 patients, respectivement. Le nombre de copies d'ADN tumoral circulant détectées dans les échantillons précédant le 2^{ème} cycle de traitement était en moyenne 5,7 fois moins élevé que dans les échantillons réalisés avant l'initiation au traitement. Cette chute quantitative a été mise en corrélation avec une réponse au traitement, constatée sur le CT scan. Chez certains patients, où la baisse du nombre de copies était de plus de 10 fois, il a été observé une augmentation de la survie sans progression : 14,7 mois contre 8,1 mois ($p < 0,05$ et HR 1,87).
 - Enfin, une étude rétrospective menée sur des patients atteints de lymphome diffus à grandes cellules B, a démontré cette application de l'ADN tumoral circulant (Reinert *et al.*, 2016). Des échantillons plasmatiques et des scanners tomodensitométriques

ont été obtenus à des moments précis tout au long de leurs traitements et à 5 ans de suivi chez 107 patients. Pour ceux diagnostiqués comme en rémission, il a été calculé que si leur taux d'ADN tumoral circulant était détectable au cours du suivi, ils avaient un risque de récurrence 228 fois supérieur à ceux n'ayant pas de taux détectable. Sur ces mêmes patients, le diagnostic de récurrence, appuyé sur les résultats des échantillons plasmatiques, a été posé en moyenne 3,5 mois avant la mise en évidence clinique sur imagerie.

L'identification de la maladie résiduelle après un traitement localisé du cancer facilite le choix de la mise en place de thérapies adjuvantes au moment où la charge tumorale est la plus faible. La détection de l'ADN tumoral circulant chez les patients venant de subir une chirurgie ou de finir la première ligne de traitement permettrait ainsi d'identifier ceux présentant un risque élevé de récurrence.

Dans cet objectif, Chaudhuri *et al* ont étudié la capacité de l'ADN tumoral circulant à identifier la maladie résiduelle (Chaudhuri *et al.*, 2017). Deux-cents cinquante-cinq échantillons provenant de 40 patients préalablement traités pour un cancer du poumon et 54 volontaires sains ont été analysés par CAPP-seq. Ces échantillons ont été collectés à 2 et 6 mois après les traitements. Chez 94% des patients présentant une récurrence, l'ADN tumoral circulant était détectable dans le premier échantillon plasmatique post-traitement. Cette détection précédait le diagnostic de récurrence par imagerie d'environ 5,2 mois chez 72% des patients. De plus, dans 53% des échantillons sanguins des patients présentant une récurrence, une mutation favorable aux inhibiteurs de la tyrosine kinase.

Tie et son équipe (Tie *et al.*, 2016) ont étudié cette utilisation de l'ADN tumoral circulant sur 230 patients atteints de cancer du côlon de stade II venant de subir une chirurgie. 178 de ces patients n'ont reçu aucune chimiothérapie adjuvante à l'opération. Parmi eux, 14 (7,9%) ont eu un ADN tumoral circulant détectable dans leurs échantillons plasmatiques. Il a été constaté que durant un suivi médian de 27 mois, 11 de ces 14 patients (=79%) ont présenté une récurrence visible par imagerie. Parmi les 164 patients n'ayant pas eu d'ADN tumoral circulant détectable dans leurs échantillons plasmatiques prélevés en post-opératoire, seulement 16 d'entre eux (9,8%) ont présenté une récurrence durant le suivi (Hazard Ratio [HR] 18, Intervalle de confiance [7,9-40], $p < 0,001$). Le suivi des 52 patients ayant été traités par une chimiothérapie adjuvante a démontré que ceux ayant un taux d'ADN tumoral circulant détectable présentait un temps de survie sans récurrence inférieur aux patients avec un taux non détectable (HR=11, IC [1,8-68], $p=0,001$).

Plus récemment, il a été démontré que l'ADN tumoral circulant était en mesure de détecter certains mécanismes de résistance acquise aux thérapies ciblées. Dans le cas du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) dans les cancers du poumon, 50%

des patients atteints de ce type de cancer développent une résistance au traitement par l'émergence d'une mutation sur le gène EGFR (Murtaza *et al.*, 2013). Ces résultats ont été, premièrement, obtenus en analysant les biopsies de patients présentant une rechute après un traitement anti-EGFR. Ils ont ensuite été confirmés par analyse du plasma, ce qui a démontré la faisabilité de détecter une résistance aux thérapies dans le sang de manière non invasive (Diaz *et al.*, 2012; Sequist *et al.*, 2011; Taniguchi *et al.*, 2011).

Des études ont mis en évidence la présence de mutations tumorales, identifiées dans l'ADN tumoral circulant, dont la présence est prédictive de la réponse aux inhibiteurs ciblés. Bettegowda *et al.* ont étudié l'évolution du profil génétique en comparant l'ADN tumoral circulant de 24 patients atteints de cancer colorectal métastatique, ayant d'abord répondu positivement au traitement et ayant ensuite récidivé (Bettegowda *et al.*, 2014). Aucune mutation n'a été détectée lors des échantillons effectués avant le traitement de ces patients. Lors de l'analyse des échantillons effectués en post-traitement, il a été observé chez 23 de ces patients (96%), l'apparition d'une ou plusieurs mutations (en moyenne 2,9 mutations par patients).

Ces observations ont également été constatées lors de différentes études réalisées sur d'autres cancers comme le cancer du poumon (Demuth *et al.*, 2018), le cancer prostatique métastatique (Goodall *et al.*, 2017) ou le cancer du sein (Merenbakh-Lamin *et al.*, 2013).

3.3. Pronostic

En étudiant la capacité de l'ADN tumoral circulant à servir de marqueur théranostique, il a été observé que le pronostic des patients atteints de cancer était inversement proportionnel à la quantité d'ADN tumoral circulant retrouvée dans leurs prélèvements sanguins, effectués lors du recrutement de ces patients dans différentes études.

Diehl *et al.* ont démontré, qu'idéalement, l'ADN tumoral circulant devait être mesuré 6 à 8 semaines après une chirurgie pour faciliter la prise de décision d'initiation d'un traitement adjuvant (Diehl *et al.*, 2008). Cette étude a été réalisée sur 18 patients atteints de cancer colorectal subissant une résection à visée curative. A partir de la biopsie de ces patients, l'équipe de recherche a créé un ensemble de sondes spécifiques à chaque patient, capable de détecter une mutation spécifique. Ces sondes ont ensuite été utilisées pour détecter et quantifier l'ADN tumoral circulant en post-opératoire. Dans cette étude, tous les patients ayant un taux post-opératoire élevé d'ADN tumoral circulant ont récidivé (Figure 35) alors que les patients présentant des taux indétectables ou bas n'ont pas présenté de rechute.

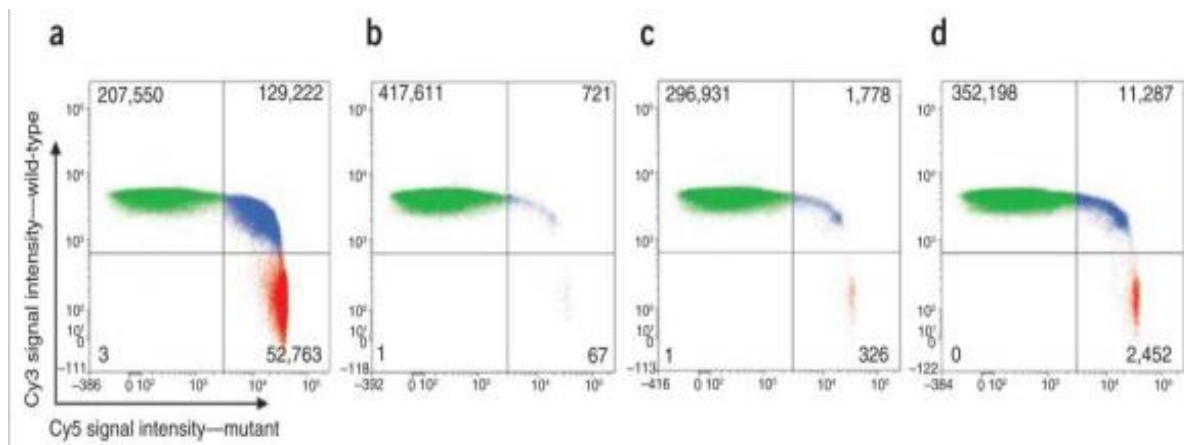


Figure 35: Evolution du taux d'ADN tumoral circulant pour un patient donné (Diehl et al., 2008)

Les points verts et rouges représentent respectivement des billes liées à des fragments d'ADN circulant de type sauvage et de mutants. Les points bleus représentent des billes liées à des fragments d'ADN de type sauvage et mutants résultant de leur inclusion dans une microgouttelette d'émulsion contenant à la fois des modèles du type sauvage et mutant. En a, avant la chirurgie du patient, le taux d'ADN tumoral circulant était de 13,4%. En b, 3 jours après la chirurgie, où le taux est de 0,015%. En c, 48 jours post-opératoires, le taux a augmenté, il est de 0,11%. En d, 244 jours après la chirurgie le taux a encore augmenté pour être à 0,66% et le patient présente une progression tumorale.

En 2012, Perkins *et al* ont réalisé une étude portant sur une centaine de patients atteints de divers cancers répartis selon la quantité d'ADN tumoral circulant retrouvé dans les échantillons (Perkins *et al.*, 2012). Quarante patients ont ainsi été classés comme ayant des concentrations faibles d'ADN tumoral circulant et 61 patients comme ayant des concentrations élevées. La survie globale médiane (SGM) de ces patients a été observée, il en est ressorti que chez les patients ayant une concentration élevée d'ADN tumoral circulant, la SGM était de 6,5 mois contrairement à l'autre groupe où la SGM était de 10,5 mois (IC à 95%; HR 2,4 ; logrank 0,0383).

Cette étude a montré que les taux totaux d'ADN tumoral circulant chez les patients atteints de cancer avancé sont, en majorité, significativement plus élevés que chez les volontaires sains, les concentrations les plus élevées étant retrouvées chez les patients atteints d'un cancer avancé de prostate et du sein.

Ces résultats ont été confirmés par plusieurs autres études, réalisées sur différents types de cancers :

- cancer du poumon (Maheswaran *et al.*, 2008) : 27 patients avec un cancer bronchique non à petites cellules métastatique présentant ou non une mutation EGFR. Un suivi du traitement a été réalisé en dosant l'ADN tumoral circulant : la réduction du nombre de copies trouvées était associée avec une réponse radiographique de la tumeur. L'augmentation du nombre de copies de l'ADN tumoral circulant chez certains patients était, quant à elle, associée à une progression de la tumeur.

- Cancer de la prostate (Annala *et al.*, 2018) : cette étude a été menée chez 201 patients atteints de cancer de la prostate métastatique résistant à la castration. Des échantillons plasmatiques ont été prélevés et de l'ADN tumoral circulant a été détecté dans 115 de ces échantillons. Ces patients ont été divisé en 3 groupes, selon la proportion d'ADN tumoral circulant retrouvé dans leurs prélèvements : groupe haut (30%-100%), moyen (2%-30%) et faible (moins de 2%). Il a été mis en évidence que les individus catégorisés dans le groupe "haut"
- Cancer du sein et ostéosarcome (McBride *et al.*, 2010): l'étude se compose en 2 étapes. La première a consisté au séquençage de génome de 2 patientes atteintes de cancer du sein canalaire invasif positif aux récepteurs d'œstrogène, l'une présentant en plus des métastases osseuses. Ce séquençage, ainsi qu'un dosage des réarrangements présélectionnés, ont été réalisés sur des prélèvements réalisés lors des différentes lignes de traitements tentées: ces réarrangements étaient encore détectables plusieurs années après la chirurgie initiale, concordant avec les rechutes et les métastases. Une troisième patiente, atteinte d'un ostéosarcome généralisé avec des métastases généralisées des tissus mous, a été incluse pour la seconde partie de l'étude pour le suivi de la progression du cancer. Il a été mis en évidence que l'augmentation subite d'ADN tumoral circulant constatée coïncidait avec l'apparition de douleurs dorsales subites. Le taux d'ADN tumoral circulant est ensuite resté élevé malgré l'initiation d'une deuxième ligne de traitement, traduisant une inefficacité thérapeutique. Une seconde augmentation du taux d'ADN tumoral a traduit une propagation de la tumeur, constatée 2-3 mois plus tard par une imagerie démontrant une invasion des tissus mous.
- Cancer colorectal métastatique (Messaoudi *et al.*, 2016) : Le statut mutationnel de 97 patients atteints de cancer colorectal métastatique a été déterminé grâce à l'analyse de leurs échantillons plasmatique. Ces volontaires ont ainsi été répartis en 3 groupes : les patients avec une mutation *BRAF*, ceux avec une mutation *KRAS* et ceux n'ayant aucune mutation de détectée. La survie globale moyenne des patients ayant une mutation *KRAS* est de 20,9 mois, celle des patients avec une mutation *BRAF* de 3,4 mois alors que les patients n'ayant eu aucune mutation de détectée avait une survie globale moyenne de 21,9 mois.

3.4. Le dépistage.

Le cancer étant la première cause de mortalité en France, le dépistage est devenu l'une des priorités de la lutte contre le cancer (Plan cancer 2014-2019). En effet, la détection précoce d'une maladie néoplasique est le meilleur espoir pour en réduire la morbidité et la mortalité. Ce dépistage consiste à détecter, à un stade précoce, une lésion chez des

personnes qui ne manifestent aucun symptôme ou signe clinique. Il existe divers types de dépistage :

- Le dépistage de masse qui porte sur la population globale. Par exemple, la mammographie pour détecter le cancer du sein.
- Le dépistage proactif ou opportuniste qui permet de dépister les patients dont le risque de cancer est plus élevé que celui du reste de la population.

Dans l'objectif d'utiliser l'ADN tumoral circulant comme outil de dépistage, plusieurs études ont voulu démontrer qu'il pouvait être détecté au début du développement tumoral (Chen *et al.*, 1999; Dolfus *et al.*, 2016; Ilie *et al.*, 2012).

Ilie *et al.* se sont penchés sur la présence d'ADN tumoral circulant dans les broncho-pneumopathies chroniques obstructives, pathologies prédisposant à un cancer pulmonaire. Dans cette étude, 5 patients présentaient un niveau élevé d'ADN tumoral circulant sans signe clinique ni radiologique de tumeur. Ces patients ont été surveillés par tomodensitométrie à faible dose tous les ans. Dans les 4 années qui ont suivies, des nodules pulmonaires ont été détectés chez ces 5 patients, correspondant histologiquement à des cancers pulmonaires débutants.

L'étude GRAIL, actuellement en cours, (A. Klein *et al.*, 2018) a pour but de développer des tests capables de détecter le cancer à un stade précoce grâce à l'utilisation de l'ADN tumoral circulant. Cette étude compare ainsi les patients atteints d'un cancer récemment diagnostiqués et non traités avec des volontaires n'étant pas atteints de cancer. Les résultats préliminaires de cette étude montrent la faculté de détecter et diagnostiquer différents cancers (cancer du sein, colorectal, ovarien, lymphome, poumon...) à différents stades (I-III et IV) avec une sensibilité de 95%.

Chan et son équipe ont étudié la capacité du virus Epstein Barr (EBV) circulant à être utilisé comme biomarqueur du carcinome nasopharyngé (Chan *et al.*, 2017). Ils ont ainsi collecté et analysé des échantillons plasmatiques chez 20 174 volontaires pour détecter l'EBV afin de dépister des patients ne présentant pas de symptômes de carcinome nasopharyngé. L'ADN de l'EBV a été détecté chez 1 112 de ces participants. Afin de confirmer ce diagnostic, un second prélèvement plasmatique a été réalisé 4 semaines après le premier et seulement 309 volontaires avaient ce second test de positif. Il a été proposé à ces 309 participants de réaliser un examen endoscopique et une IRM et il s'avère que 34 d'entre eux ont été diagnostiqués comme atteints un carcinome nasopharyngé. A contrario, un seul patient ayant eu un résultat négatif au premier prélèvement plasmatique a développé un carcinome nasopharyngé. La sensibilité et la spécificité calculées de ce dépistage étaient respectivement de 97,1 et 98%.

Illie et son équipe (Illie *et al.*, 2014) ont récemment mis au point un processus de dépistage du cancer du poumon dont l'étude a été concluante : 245 volontaires ont participé à cette étude, dont 168 appartenant à une population jugée à risque du cancer du poumon, car fortement fumeurs et atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive. Les 77 autres participants étaient des volontaires ne présentant pas de risque élevé de développer un cancer du poumon. Un prélèvement sanguin ainsi qu'une imagerie ont été réalisés chez tous les participants de cette étude. Parmi les 168 patients à risque élevé, le prélèvement sanguin a mis en évidence un taux élevé d'ADN tumoral circulant chez 5 d'entre eux, alors que l'imagerie réalisée en parallèle ne permettait de détecter aucun nodule au niveau pulmonaire. Chez ces 5 patients, un nodule pulmonaire est devenu détectable 1 à 4 ans après le prélèvement sanguin, une opération a été immédiatement réalisée et la biopsie a confirmé le diagnostic de cancer du poumon, aucun de ces patients n'a ensuite montré de signe de récurrence, laissant penser que le cancer a été éradiqué. En parallèle, aucun des 77 patients contrôle n'a eu de test de dépistage positif ni développé de nodule pulmonaire lors du suivi.

Dans l'objectif de ne pas être contraint de réaliser un test de dépistage pour chaque type de cancer, Cohen *et al.* ont développé et évalué un test appelé CancerSeek sur 1005 patients atteints de cancer et 812 volontaires sains (Cohen *et al.*, 2018). Ce test a été mis au point pour détecter 8 des cancers les plus communs : sein, colorectal, des poumons, de l'œsophage, du pancréas, de l'estomac, du foie et des ovaires. Il combine ainsi une PCR méthylation spécifique de 16 mutations spécifiques avec 10 biomarqueurs de protéines circulantes, ce qui permet non seulement de savoir si le sujet est atteint d'un cancer mais en plus de pouvoir déterminer la localisation de ce dernier. Cette étude a démontré une spécificité de 99% (seulement 8 faux positifs sur les 812 volontaires sains) et des sensibilités comprises entre 69% et 98% selon le type de cancers (Figure 36). En plus de présenter un avantage non négligeable dans la détection précoce, l'équipe en charge de l'essai a également souligné le coût de ce test : moins de 500\$ US.

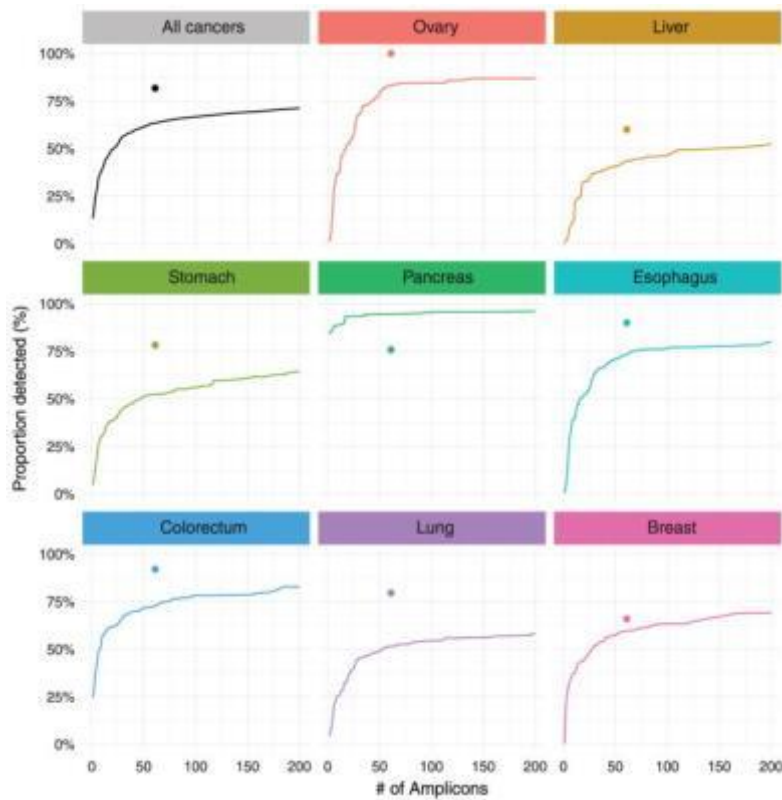


Figure 36: Détection des différents cancers par le test CancerSeek (Cohen et al., 2018)

Les courbes colorées indiquent la proportion de cancers détectés dans les huit types évalués en fonction du nombre d'amplicons courts (<40 pb). La sensibilité de la détection augmente avec le nombre d'amplicons mais de plateau à environ 60 amplicons. Les points colorés indiquent la fraction des cancers détectés en utilisant le panel de 61 amplicons utilisés les différents cancers évalués dans l'étude, ce qui représente une moyenne de 82%.

Ces études sont un premier pas vers l'utilisation concrète de l'ADN tumoral circulant comme outil de dépistage proactif. Cette avancée dans le domaine du dépistage permet en effet un diagnostic précoce au moment où le cancer est encore localisé, permettant une meilleure prise en charge.

4. Design des essais cliniques utilisant l'ADN tumoral circulant.

L'oncologie, et plus précisément le développement des thérapies ciblées, est un domaine en pleine expansion dans les essais cliniques. Dans cet objectif de développement d'une prise en charge optimale des patients, l'utilisation de l'ADN tumoral circulant s'avère être un point intéressant pour la sélection et le suivi des patients.

Malgré les avantages non négligeables que présente l'utilisation de la biopsie liquide, il n'y a, à l'heure actuelle, que peu d'essais cliniques utilisant cette méthode pour la sélection et le suivi des patients tout au long d'une étude. Cependant, un premier pas dans cette démarche a été réalisé grâce au lancement, en 2018, de divers programmes utilisant la biopsie liquide pour permettre aux volontaires d'intégrer un essai clinique si leur profilage le permettait.

L'institut Gustave Roussy a lancé fin 2018 le programme PROFEEL. Ce programme a pour but de permettre l'accès à des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique l'accès à des thérapies innovantes par la réalisation d'un portrait moléculaire sur l'ADN tumoral circulant. Ce profilage a pour but de réaliser un premier screening des patientes pour ensuite leur proposer, quand les critères d'inclusions sont remplis, des études en cours pour testés des thérapies ciblées adapter à leur cancer.

Rothwell et son équipe ont lancé l'étude TARGET qui utilise l'ADN tumoral circulant pour déterminer des mutations cliniquement exploitables chez des patients atteints de cancer intermédiaire (Rothwell *et al.*, 2019). Ce test est basé sur l'analyse de 641 gènes associées au cancer. Cette étude est divisée en 2 phases : la phase A qui inclus 100 patients et qui a pour objectif d'évaluer la faisabilité de la détection de mutation par biopsie liquide de façon systématique, dans un délai de 2 à 4 semaines, pour pouvoir orienter les patients atteints de cancer avancé à un essai de phase I d'un traitement approprié. La phase B inclus 450 patients et a pour but de valider cette capacité à orienter les patients dans différents essais cliniques sur la base des résultats obtenus à partir des échantillons sanguins. Les résultats de la partie A de cette étude viennent d'être publiés : afin d'éliminer au mieux les faux positifs, il a été appliqué un seuil de de 2,5% de fréquence allélique pour chaque mutation. Au total, des mutations ont été détectées à temps pour entrainer une orientation vers un essai clinique chez 41 patients. 11 d'entre eux ont ainsi reçu un traitement adapté, les 17 autres n'ayant pas reçu de traitement adapté principalement pour des raisons d'absence d'essais cliniques en cours sur le site. Les 13 autres patients ne pouvaient être inclus dans aucun essai clinique (critère d'exclusion, ont démarré une chimiothérapie...). Parmi les 11 patients ayant reçu un traitement adapté, 4 d'entre eux ont

démontré une réponse partielle au traitement à l'essai, une maladie stable a été constatée chez les 7 autres patients.

Pour faire suite à cette première démarche, et devant l'absence de publications concernant la biopsie liquide utilisée du screening à l'adaptation de traitement, j'ai développé le synopsis d'un protocole pour un essai de phase III dans le cancer colorectal métastatique présentant une mutation *RAS*: « Etude démontrant la supériorité de l'ADN tumoral circulant par rapport à la méthode standardisée dans le suivi et l'adaptation de traitement chez les patients naïfs, atteint de cancer colorectal métastatique muté *RAS*. »

I. Rationnel de l'étude

Le but de DNA-OPTIMAL (Superiority of circulating tumor **DNA** compared to the standardized method for **m**onitoring and **ada**ptation of **T**reatment in chemotherapy naive patient with wild-type *RAS* **M**etastatic colorect**AL** cancer), étude de phase III randomisée multicentrique, est de démontrer la supériorité de l'utilisation de l'ADN tumoral circulant par rapport aux méthodes standardisées dans le dépistage, le monitoring et l'adaptation des traitements chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique *RAS* sauvage. Ces méthodes standardisées sont la biopsie tumorale pour le diagnostic et le choix de la première ligne de traitement puis l'imagerie médicale (PET-scan) avec critère RECIST pour le suivi de l'efficacité de ce dernier.

L'ADN tumoral circulant a montré son équivalence à la biopsie tumorale, en termes de spécificité et de sensibilité, avec un gain de temps (Bachet et al., 2018b; Thierry et al., 2014) . Il a également montré sa représentativité de la charge tumorale tout au long du suivi réalisé dans différentes études (Reinert et al., 2016 ; Tie et al., 2016).

L'hypothèse formulée est ici est de démontrer la supériorité du suivi des patients par l'ADN tumoral circulant par rapport aux méthodes standardisées dans la Survie sans progression (PFS) et dans la survie globale (OS).

II. Objectifs de la recherche

a. Objectif principal

L'objectif principal de DNA-OPTIMAL est de montrer une augmentation de la PFS et de l'OS chez les patients naïfs atteints de cancer colorectal métastatique non-muté *RAS* suivi par biopsie liquide par rapport à ceux suivi par imagerie médicale

b. Objectifs secondaires

Les objectifs secondaires de cette étude sont les suivants :

- Comparaison du nombre de ligne de traitements administrés entre les deux bras d'étude.
- Comparaison entre les deux bras du temps moyen avant la ré-administration d'une ligne de traitement en cas de rechute.

- Comparaison entre les deux bras du temps moyen pour la détection de mécanisme de résistance acquise.

III. Conception de la recherche.

Voulant démontrer la supériorité de l'analyse de l'ADN tumoral circulant par rapport aux méthodes standardisées chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique non muté *RAS*, nous réalisons un essai clinique multicentrique Européen.

C'est un essai clinique de phase III de supériorité comparant deux groupes parallèles de 145 patients chacun, pendant une durée maximale de 48 mois ou jusqu'au retrait de consentement du patient ou jusqu'au décès de celui-ci, en fonction de ce qui se produira en premier.

Le premier groupe aura un suivi réalisé exclusivement par biopsie liquide : des prélèvements sanguins seront réalisés juste avant l'administration du traitement et 8 jours après. Ce schéma de prélèvement devra être reproduit avant chaque cycle de traitement tout au long de l'étude.

Le second groupe sera suivi de manière conventionnelle, par imagerie médicale, qui sera réalisée toutes les 8 à 10 semaines conformément aux protocoles de soins courants.

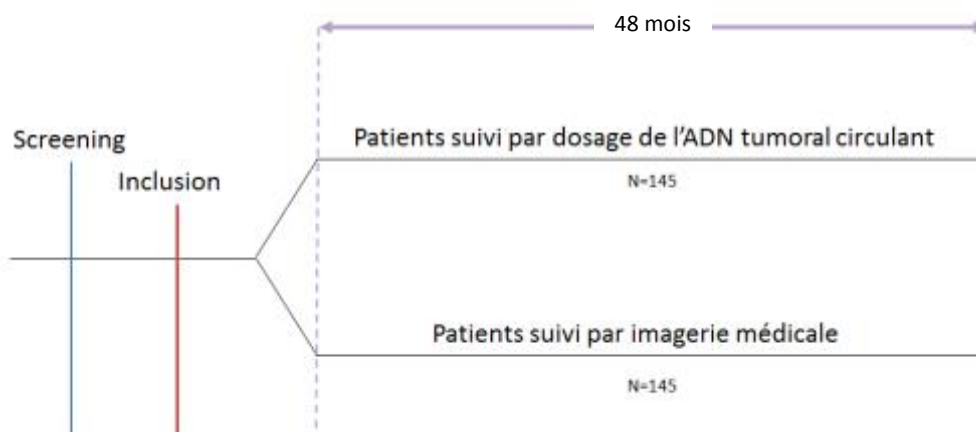


Figure 37: Schéma représentant le principe de l'étude DNA-OPTIMAL.

IV. Méthode

DNA-OPTIMAL est une étude de phase III, internationale, multicentrique, ouverte randomisée en 2 groupes parallèles (ctDNA et méthodes standardisées), qui va inclure 290 patients dans 85 centres.

Tous les centres participants devront avoir la norme ISO 15 189 pour les laboratoires de biologie médicale et la norme ISO 17 025 pour les laboratoires industriels garantissant une analyse de l'ADN tumoral circulant homogène entre les différents sites.

V. Critères d'éligibilité

a. Critère d'inclusion

- Hommes et Femmes entre 18 et 80 ans.
- Diagnostic confirmé histologiquement de cancer colorectal métastatique non muté *RAS*.
- Aucun traitement pour le cancer colorectal métastatique non muté *RAS* initié.
- Personnes affiliée ou bénéficiaire d'un régime de sécurité sociale.
- Consentement libre, éclairé et écrit signé par le participant (ou son représentant légal) et l'investigateur au plus tard le jour avant l'inclusion et avant tout examen nécessité par la recherche.
- Patient qui a une bonne compréhension du protocole de l'essai clinique.

b. Critères de non inclusion

- Patient volontaire ayant des impératifs prévus durant leur durée de participation à l'essai.
- Femmes enceintes ou n'étant pas sous double contraception ou dont la ménopause n'est pas établie.
- Personne placée sous sauvegarde de la justice, personne participant à une autre recherche simultanément ou comportant une période d'exclusion toujours en cours, qui a une santé physique et/ou psychologique sévèrement altérée qui peut affecter la compliance du participant à l'étude.

VI. Procédures de la recherche

a. Procédure expérimental(e)

La procédure expérimentale utilisée est l'analyse de l'ADN tumoral circulant obtenu par prélèvement sanguin à J+0 et J+8 de chaque cycle de traitement.

Les échantillons plasmatiques seront analysés sur site premièrement par méthode NGS afin d'obtenir un séquençage large puis plus spécifiquement par ddPCR pour rechercher des mutations tronculaires spécifiques afin de permettre une identification de la mutation recherchée ainsi que le dosage de cette dernière afin de permettre une adaptation rapide du traitement si celui-ci s'avère inefficace ou si l'on constate une récurrence.

b. Procédure de comparaison

Dans le groupe témoin, les patients seront suivis par imagerie médicale réalisée toutes les 8 à 10 semaines. Si une progression du cancer ou une récurrence post-rémission est constatée, une biopsie tumorale pourra être effectuée.

VII. Traitements associé(e)s

Les traitements associés à cette étude sont ceux relevant du traitement du patient selon ce que l'investigateur jugera le plus adapté selon les résultats du patient :

Protocole FOLFOX : 5-fluorouracile, acide folinique et oxaliplatine.

Protocole FOLFIRI : 5-fluorouracile, acide folinique et irinotecan

Ajout ou non de Bevacizumab ou Cetuximab à ces protocoles.

VIII. Déroulement de la recherche

a. Calendrier de la recherche

- Durée de la période d'inclusion : 24 mois.
- Durée de participation de chaque participant : 48 mois ou jusqu'au retrait de consentement ou jusqu'au décès, selon ce qui survient en premier.
- Durée totale de la recherche (durée de la période d'inclusion + durée de participation) : 6 ans

b. Tableau récapitulatif du suivi participant

Participant ayant intégré le premier groupe, avec suivi par prélèvement sanguin.

	Pré inclusion T- 7J	Inclusion J 0	Visite J 8	Cycle n+1		Visite M48
				J0	J+8	
Consentement éclairé	✓					
Dosage β HCG plasmatiques ¹	✓					
Examen clinique ²	✓	✓	✓	✓		✓
Bilan biologique ³	✓	✓	✓	✓		✓
Prélèvement sanguin pour dosage ctDNA ⁴		✓				✓

¹Dosage de HCG uniquement pour les femmes afin d'éviter le risque de grossesse.

²Examen clinique : pesée, pression artérielle, réflexe ostéotendineux.

³Bilan biologique : prise de sang examen de soin pour tous les patients

⁴Prélèvement sanguin pour analyse de ctDNA réalisé uniquement sur les patients du groupe expérimental.

Les médecins investigateurs oncologues dans chaque centre réaliseront toutes les visites, à la même heure, pour chaque patient lors des consultations à l'hôpital.

Sur 48 mois de participation, le patient aura 96 visites, soit deux tous les mois : J0 avant le traitement, J+8 après le traitement afin de réaliser le dosage du nombre de copies/ml de retrouvée dans les échantillons sanguins.

Participant ayant intégré le deuxième groupe, avec suivi par imagerie médicale.

	Pré inclusion T-10J	Inclusion J 0	Visite J 8	Cycle n+1	Tous les 2 mois	Visite M48
				J0		
Consentement éclairé	✓					
Dosage β HCG plasmatiques ¹	✓					

Examen clinique ²	✓	✓	✓	✓		✓
Bilan biologique ³	✓	✓	✓	✓		✓
Examen radiologique ⁴		✓			✓	
Biopsie tumorale ⁵				✓	✓	✓

¹Dosage de HCG uniquement pour les femmes afin d'éviter le risque de grossesse.

²Examen clinique : pesée, pression artérielle, réflexe ostéotendineux.

³Bilan biologique : prise de sang examen de soin pour tous les patients

⁴ Examen par imagerie médicale réalisé uniquement pour le groupe de patient suivi par les méthodes standardisées.

⁵Biopsie tumorale réalisée seulement si progression

Les médecins investigateurs oncologues dans chaque centre réaliseront toutes les visites, à la même heure, pour chaque patient lors des consultations à l'hôpital.

Sur 48 mois de participation, le patient aura 48 visites, soit une tous les mois: pour l'administration du traitement. Tous les deux mois, une imagerie médicale sera réalisée en plus, avant l'initiation du cycle de traitement, soit à M+0, M+2, M+4, M+6, M+8, M+10, M+12, M+14, M+16, M+18, à M+20, M+22, M+24, M+26, M+28, à M+30, M+32, M+34, M+36, M+38, M+40, M+42, M+44, M+46 et M+48.

c. Visite de pré-inclusion/inclusion

La visite de pré-inclusion/inclusion est assurée par le médecin investigateur. La visite de pré-inclusion a lieu entre 2 et 1 semaine avant la visite d'inclusion. Avant tout examen lié à la recherche, l'investigateur recueille le consentement libre, éclairé et écrit du participant (ou de son représentant légal le cas échéant).

L'examen clinique comprend la pesée, la mesure de la pression artérielle. Une prise de sang sera effectuée pour vérifier que l'état général du patient. Un dosage de la β HCG plasmatique est nécessaire pour les femmes afin de s'assurer qu'elles ne sont pas enceintes et d'éviter ainsi tout risque de tératogénicité.

d. Visite/démarche de randomisation

La randomisation en aveugle est effectuée par le médecin investigateur via l'IWRS. Celle-ci est réalisée après vérification des critères d'éligibilité lors de la visite d'inclusion des patients à J0 afin de les séparer en deux groupes : suivi par biopsie liquide vs suivi par imagerie médicale. Le consentement éclairé des patients doit être signé avant randomisation (visite de pré-inclusion).

L'IWRS communique immédiatement le numéro unique du patient dans la recherche au médecin investigateur.

e. Visites de suivi

Pour le groupe de suivi expérimental : le patient aura deux visites sur site tous les mois (J0 à J8), afin de réaliser le prélèvement sanguin nécessaire pour le dosage de l'ADN tumoral circulant. L'administration de son traitement aura à J0 après le prélèvement sanguin.

Pour le groupe de suivi standardisé : le patient aura une visite sur site tous les mois (J0), afin de recevoir son traitement. Tous les deux mois, une imagerie médicale sera réalisée en plus, avant l'initiation du cycle de traitement, soit à M+0, M+2, M+4, M+6, M+8, M+10, M+12, M+14, M+16, M+18, à M+20, M+22, M+24, M+26, M+28, à M+30, M+32, M+34, M+36, M+38, M+40, M+42, M+44, M+46 et M+48.

IX. Aspects statistiques

a. Calcul de la taille de l'échantillon

Cette étude est une étude de supériorité de la méthode de suivi par biopsie liquide par rapport au méthode standardisée. Il y a deux groupes de randomisation en bras parallèle, le premier groupe étant suivi par prélèvement sanguin pendant toute la durée de l'étude, le second étant suivi par l'imagerie médicale. Le critère de jugement principal est un critère clinique, il s'agit de l'augmentation de la PFS ou de l'OS pour les patients suivi par biopsie liquide.

L'hypothèse de l'étude est une hypothèse unilatérale, la durée de la survie sans progression ou la survie globale sera plus grande pour les patients suivis par biopsie liquide que pour les patients suivis par imagerie médicale. Dans cette étude, la différence cliniquement acceptable est une augmentation de la PFS ou de l'OS de 20% pour le groupe suivi par biopsie liquide. Le risque α est fixé à 5% et la puissance de test à 90%. L'effectif nécessaire pour conduire l'étude est de 136 personnes par bras d'étude, soit un total de 272 personnes (Test X^2 corrigé). Le risque de perdus de vue a été estimé à 2% par année de suivi, soit 18 personnes.

Le nombre de sujet nécessaire serait ainsi de 290 patients.

5. Conclusion

Le cancer étant actuellement la deuxième cause de mortalité dans le monde, l'amélioration de leur prise en charge et des traitements sont devenus des enjeux majeurs de santé publique. Afin de répondre à ces objectifs, la détection d'altérations somatiques tumorales est une étape systématique afin d'orienter, si possible, vers des thérapies ciblées.

Dans cette continuité, l'ADN tumoral circulant est une avancée majeure. En effet, la concordance des résultats entre la biopsie tumorale et la biopsie liquide a été de nombreuses fois prouvée (Bettegowda et al., 2014; De Mattos-Arruda et al., 2014b; Newman et al., 2016; Yip et al., 2010) A ces résultats, s'ajoutent de nombreux avantages tels que le caractère non invasif du prélèvement, la réduction du coût d'analyse, la rapidité des résultats ainsi que la capacité et la facilité à réaliser de nombreux prélèvements tout au long de la maladie.

Afin d'optimiser les résultats des prélèvements, nous avons vu que de nombreuses conditions pré-analytiques peuvent influencer sur la qualité des échantillons plasmatiques. Des nombreuses études réalisées sur ce sujet, il en ressort que, pour optimiser la quantité d'ADN tumoral circulant à doser, les prélèvements doivent être réalisés dans des tubes contenant l'anticoagulant EDTA, et peuvent être stockés à -80°C , -20°C ou $+4^{\circ}\text{C}$ jusqu'à 9 mois sans incidence particulière sur la qualité des échantillons plasmatiques. Les échantillons plasmatiques peuvent être congelés et décongelés jusqu'à 3 fois sans compromettre leur intégrité. En revanche, si ces derniers sont stockés à température ambiante, l'analyse doit se faire dans les 4 heures suivant le prélèvement.

De nombreuses études ont également été réalisées sur les conditions analytiques, il a ainsi été démontré que pour une quantification optimale de l'ADN tumoral circulant, la protéinase K et le NTI sont respectivement l'agent dénaturant et le tampon de liaison à privilégier. Les prélèvements doivent être préparés dans des tubes standard d'Eppendorf de 1,5ml, avec pour volume d'élution optimal 60 μl et un régime d'élution de 3 fois 20 μl .

Concernant les méthodes analytiques, nombreuses sont celles actuellement utilisées dans les publications. Parmi les plus couramment retrouvées dans ces articles, nous y retrouvons les méthodes basées sur la technique de séquençage nouvelles génération.

Nous avons pu voir durant ce travail que l'ADN tumoral circulant était représentatif de la charge tumorale, ce qui permettait son utilisation tout au long des différentes étapes du traitement des cancers. En effet, il a été démontré que l'emploi de l'ADN tumoral circulant comme marqueur théranostique était une plus-value à la biopsie tumorale car il était plus représentatif de l'hétérogénéité tumorale (Wyatt *et al.*, 2018). A cet avantage s'ajoute le gain de temps non négligeable que représente la biopsie liquide pour obtenir les résultats : quand il faut 10 jours avec la biopsie tumorale, 5 suffisent lors d'une analyse par NGS (Thierry *et al.*, 2017).

L'utilisation de l'ADN tumoral circulant pour le suivi de l'efficacité du traitement a également été démontrée : de par sa demi-vie courte, 16 minutes, il est possible d'ajuster rapidement la stratégie de traitement alors que la charge tumorale est encore faible (Haber and Velculescu, 2014). En effet, étant représentatif de la charge tumorale, le dosage de l'ADN tumoral circulant permet de d'évaluer rapidement si la stratégie de traitement initiée est efficace ou non. De plus, la détection de maladie résiduelle via la biopsie liquide permet de statuer si la mise en place d'un traitement adjuvant est pertinente, (Chaudhuri *et al.*, 2017) notamment si une résistance acquise aux thérapies ciblées est décelée (Murtaza *et al.*, 2013).

Récemment la démonstration de l'utilité de l'ADN tumoral circulant dans le dépistage s'est avérée intéressante et prometteuse : le test de dépistage CancerSeek (Cohen *et al.*, 2018) a montré une spécificité de 99% pour des sensibilités comprises entre 69 et 98% en fonction du type de cancer. Les résultats préliminaires de l'étude GRAIL (Klein *et al.*, 2018) ont montré la capacité de l'ADN tumoral circulant à dépister tous types de cancer avec une spécificité de 95%.

Malgré des résultats prometteurs, la biopsie liquide n'est pas encore une méthode standardisée. En effet, seuls quelques tests commerciaux ont obtenu l'autorisation de la FDA et de l'EMA pour être utilisés, comme Cobas[®] de Roche ou Therascreen[®] de Qiagen pour la détection de mutations EGFR dans le cancer pulmonaire métastatique pour la mise en place de traitement anti-EGFR. De ce fait, très peu d'études cliniques sur de nouvelles thérapies utilisent la biopsie liquide comme méthode de screening ou comme méthode de monitoring.

Cependant, le lancement des récents programmes tels que PROFEEL ou TARGET visant à orienter les patients vers des essais cliniques sur la base du séquençage de leurs échantillons plasmatiques laisse à penser que l'utilisation de l'ADN tumoral circulant dans la pratique clinique n'en n'est qu'au commencement. Nous pouvons envisager qu'à terme cette méthode complètera la biopsie tumorale et l'imagerie médicale pour le suivi des patients, permettant aux patients d'avoir une prise en charge plus rapide et plus efficace ainsi qu'un meilleur confort de suivi.

Bibliographie

A. Klein, E., Hubbell, E., Maddala, T., Aravanis, A., F. Beausang, J., Filippova, D., Gross, S., Jamshidi, A., Kurtzman, K., Shen, L., et al. (2018). Development of a comprehensive cell-free DNA (cfDNA) assay for early detection of multiple tumor types: The Circulating Cell-free Genome Atlas (CCGA) study.

Agena Bioscience GmbH MassARRAY® Dx - Agena Bioscience.

Anker, P., Stroun, M., and Maurice, P.A. (1975). Spontaneous Release of DNA by Human Blood Lymphocytes as Shown in an *in Vitro* System. *Cancer Res.* 35, 2375.

Annala, M., Vandekerkhove, G., Khalaf, D., Taavitsainen, S., Beja, K., Warner, E.W., Sunderland, K., Kollmannsberger, C., Eigl, B.J., Finch, D., et al. (2018). Circulating Tumor DNA Genomics Correlate with Resistance to Abiraterone and Enzalutamide in Prostate Cancer. *Cancer Discov.* 8, 444–457.

Aro, K., Wei, F., Wong, D.T., and Tu, M. (2017). Saliva Liquid Biopsy for Point-of-Care Applications. *Front. Public Health* 5.

Bachet, J.B., Bouché, O., Taieb, J., Dubreuil, O., Garcia, M.L., Meurisse, A., Normand, C., Gornet, J.M., Artru, P., Louafi, S., et al. (2018a). RAS mutation analysis in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: the AGEO RASANC prospective multicenter study. *Ann. Oncol.* 29, 1211–1219.

Bachet, J.B., Bouché, O., Taieb, J., Dubreuil, O., Garcia, M.L., Meurisse, A., Normand, C., Gornet, J.M., Artru, P., Louafi, S., et al. (2018b). RAS mutation analysis in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: the AGEO RASANC prospective multicenter study. *Ann. Oncol.* 29, 1211–1219.

Ballester, L.Y., Glitza Oliva, I.C., Douse, D.Y., Chen, M.M., Lan, C., Haydu, L.E., Huse, J.T., Roy-Chowdhuri, S., Luthra, R., Wistuba, I.I., et al. (2018). Evaluating Circulating Tumor DNA From the Cerebrospinal Fluid of Patients With Melanoma and Leptomeningeal Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 77, 628–635.

Bashashati, A., Ha, G., Tone, A., Ding, J., Prentice, L.M., Roth, A., Rosner, J., Shumansky, K., Kalloger, S., Senz, J., et al. (2013). Distinct evolutionary trajectories of primary high-grade serous ovarian cancers revealed through spatial mutational profiling. *J. Pathol.* 231, 21–34.

Berckmans, R.J., Nieuwland, R., Böing, A.N., Romijn, F.P., Hack, C.E., and Sturk, A. (2001). Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb. Haemost.* 85, 639–646.

Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R.J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., Bartlett, B.R., Wang, H., Luber, B., Alani, R.M., et al. (2014). Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Sci. Transl. Med.* 6, 224ra24-224ra24.

Beutler, E., Gelbart, T., and Kuhl, W. (1990). Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *BioTechniques* 9, 166.

Bidard, F.-C. (2008). Interaction and intercellular cooperation during the metastatic process. Theses. Université Paris Sud - Paris XI.

BIOKE NucleoSpin Plasma XS.

Board, R.E., Williams, V.S., Knight, L., Shaw, J., Greystoke, A., Ranson, M., Dive, C., Blackhall, F.H., and Hughes, A. (2008). Isolation and Extraction of Circulating Tumor DNA from Patients with Small Cell Lung Cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1137, 98–107.

Board, R.E., Wardley, A.M., Dixon, J.M., Armstrong, A.C., Howell, S., Renshaw, L., Donald, E., Greystoke, A., Ranson, M., Hughes, A., et al. (2010). Detection of *PIK3CA* mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 120, 461–467.

Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., and van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495–503.

Bosc, C., Ferretti, G.R., Cadranet, J., Audigier-Valette, C., Besse, B., Barlesi, F., Decroisette, C., Lantuejoul, S., Arbib, F., and Moro-Sibilot, D. (2015). Rebiopsy during disease progression in patients treated by TKI for oncogene-addicted NSCLC. *Target. Oncol.* 10, 247–253.

Bottema, C.D.K., and Sommer, S.S. (1993). PCR amplification of specific alleles: Rapid detection of known mutations and polymorphisms. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 288, 93–102.

Bronkhorst, A.J., Aucamp, J., and Pretorius, P.J. (2015). Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clin. Chim. Acta* 450, 243–253.

Brooks, J.D. (2012). Translational genomics: The challenge of developing cancer biomarkers. *Genome Res.* 22, 183–187.

Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169–193.

Caen, O., Nizard, P., Garrigou, S., Perez-Toralla, K., Zonta, E., Laurent-Puig, P., and Taly, V. (2015). PCR digitale en micro-compartiments. *Med Sci Paris* 31, 180–186.

Cai, X., Janku, F., Zhan, Q., and Fan, J.-B. (2015). Accessing Genetic Information with Liquid Biopsies. *Trends Genet.* 31, 564–575.

Carmaux, S. (2008). Caractérisation de la mort des cellules animales cultivées en bioréacteur. Université de Lorraine.

Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249.

Casaux (2018). Les examens de dépistage des cancers.

Chan, K.C.A., Yeung, S.-W., Lui, W.-B., Rainer, T.H., and Lo, Y.M.D. (2005). Effects of Preanalytical Factors on the Molecular Size of Cell-Free DNA in Blood. *Clin. Chem.* 51, 781–784.

Chan, K.C.A., Woo, J.K.S., King, A., Zee, B.C.Y., Lam, W.K.J., Chan, S.L., Chu, S.W.I., Mak, C., Tse, I.O.L., Leung, S.Y.M., et al. (2017). Analysis of Plasma Epstein–Barr Virus DNA to Screen for Nasopharyngeal Cancer.

Chang-Hao Tsao, S., Weiss, J., Hudson, C., Christophi, C., Cebon, J., Behren, A., and Dobrovic, A. (2015). Monitoring response to therapy in melanoma by quantifying circulating tumour DNA with droplet digital PCR for BRAF and NRAS mutations. *Sci. Rep.* 5, 11198.

Chaudhuri, A.A., Chabon, J.J., Lovejoy, A.F., Newman, A.M., Stehr, H., Azad, T.D., Khodadoust, M.S., Esfahani, M.S., Liu, C.L., Zhou, L., et al. (2017). Early Detection of Molecular Residual Disease in Localized Lung Cancer by Circulating Tumor DNA Profiling. *Cancer Discov.* 7, 1394–1403.

Chen, C.W., and Thomas, C.A. (1980). Recovery of DNA segments from agarose gels. *Anal. Biochem.* 101, 339–341.

Chen, X. qi, Bonnefoi, H., Diebold-Berger, S., Lyautey, J., Lederrey, C., Faltin-Traub, E., Stroun, M., and Anker, P. (1999). Detecting Tumor-related Alterations in Plasma or Serum DNA of Patients Diagnosed with Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* 5, 2297.

Chen, X.Q., Stroun, M., Magnenat, J.L., Nicod, L.P., Kurt, A.M., Lyautey, J., Lederrey, C., and Anker, P. (1996). Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat. Med.* 2, 1033–1035.

Chen, Z., Fadiel, A., Naftolin, F., Eichenbaum, K.D., and Xia, Y. (2005). Circulation DNA: Biological implications for cancer metastasis and immunology. *Med. Hypotheses* 65, 956–961.

Chiu, R.W.K., Poon, L.L.M., Lau, T.K., Leung, T.N., Wong, E.M.C., and Lo, Y.M.D. (2001). Effects of Blood-Processing Protocols on Fetal and Total DNA Quantification in Maternal Plasma. *Clin. Chem.* *47*, 1607.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* *162*, 156–159.

Cohen, J.D., Li, L., Wang, Y., Thoburn, C., Afsari, B., Danilova, L., Douville, C., Javed, A.A., Wong, F., Mattox, A., et al. (2018). Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* *359*, 926–930.

Couraud, S., Vaca-Paniagua, F., Villar, S., Oliver, J., Schuster, T., Blanché, H., Girard, N., Trédaniel, J., Guilleminault, L., Gervais, R., et al. (2014). Noninvasive Diagnosis of Actionable Mutations by Deep Sequencing of Circulating Free DNA in Lung Cancer from Never-Smokers: A Proof-of-Concept Study from BioCAST/IFCT-1002. *Clin. Cancer Res.* *20*, 4613.

Dawson, S.-J., Tsui, D.W.Y., Murtaza, M., Biggs, H., Rueda, O.M., Chin, S.-F., Dunning, M.J., Gale, D., Forshew, T., Mahler-Araujo, B., et al. (2013). Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer.

De Mattos-Arruda, L., Bidard, F.-C., Won, H.H., Cortes, J., Ng, C.K.Y., Peg, V., Nuciforo, P., Jungbluth, A.A., Weigelt, B., Berger, M.F., et al. (2014a). Establishing the origin of metastatic deposits in the setting of multiple primary malignancies: The role of massively parallel sequencing. *Mol. Oncol.* *8*, 150–158.

De Mattos-Arruda, L., Weigelt, B., Cortes, J., Won, H.H., Ng, C.K.Y., Nuciforo, P., Bidard, F.C., Aura, C., Saura, C., Peg, V., et al. (2014b). Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: a proof-of-principle. *Ann. Oncol.* *25*, 1729–1735.

Demuth, C., Winther-Larsen, A., Madsen, A.T., Meldgaard, P., and Sorensen, B.S. (2018). A method for treatment monitoring using circulating tumour DNA in cancer patients without targetable mutations. *Oncotarget* *9*, 31066–31076.

Devonshire, A.S., Whale, A.S., Gutteridge, A., Jones, G., Cowen, S., Foy, C.A., and Huggett, J.F. (2014). Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Anal. Bioanal. Chem.* *406*, 6499–6512.

Diaz, L.A., Williams, R., Wu, J., Kinde, I., Hecht, J.R., Berlin, J., Allen, B., Bozic, I., Reiter, J.G., Nowak, M.A., et al. (2012). The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* *486*, 537–540.

Diaz, L.A., Sausen, M., Fisher, G.A., and Velculescu, V.E. (2013). Insights into therapeutic resistance from whole-genome analyses of circulating tumor DNA. *Oncotarget* 4, 1856–1857.

Didelot, A. (2017). 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.

Diehl, F., Li, M., Dressman, D., He, Y., Shen, D., Szabo, S., Diaz, L.A., Goodman, S.N., David, K.A., Juhl, H., et al. (2005). Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16368–16373.

Diehl, F., Schmidt, K., Choti, M.A., Romans, K., Goodman, S., Li, M., Thornton, K., Agrawal, N., Sokoll, L., Szabo, S.A., et al. (2008). Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat. Med.* 14, 985–990.

Dolfus, C., Toure, E., Blanchard, F., and Sabourin, J.-C. (2016). Les biomarqueurs circulants du cancer : avantages et perspectives. *Anat. Cytol. Pathol.* 2016, 51–57.

El Messaoudi, S., Rolet, F., Mouliere, F., and Thierry, A.R. (2013). Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin. Chim. Acta* 424, 222–230.

Fan, H.C., Blumenfeld, Y.J., Chitkara, U., Hudgins, L., and Quake, S.R. (2010). Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by paired-end sequencing. *Clin. Chem.* 56, 1279–1286.

Fleischhacker, M., and Schmidt, B. (2007). Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—A survey. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1775, 181–232.

Foreman, D., Bray, F., Brewster, D., and al (2014). *Cancer Incidence in Five Continents. X.*

Forsheo, T., Murtaza, M., Parkinson, C., Gale, D., Tsui, D.W.Y., Kaper, F., Dawson, S.-J., Piskorz, A.M., Jimenez-Linan, M., Bentley, D., et al. (2012). Noninvasive Identification and Monitoring of Cancer Mutations by Targeted Deep Sequencing of Plasma DNA. *Sci. Transl. Med.* 4, 136ra68.

Fournié, G.J., Courtin, J.-P., Laval, F., Chale, J.-J., Pourrat, J.P., Pujazon, M.-C., Lauque, D., and Carles, P. (1995). Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours. *Cancer Lett.* 91, 221–227.

G. L. Semenza (2009). HIF-1 Inhibitors for Cancer Therapy: From Gene Expression to Drug Discovery. *Curr. Pharm. Des.* 15, 3839–3843.

García-Olmo, D., García-Olmo, D.C., Ontañón, J., Martínez, E., and Vallejo, M. (1999). Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genomastasis. *Histol. Histopathol.* *14*, 1159–1164.

García-Olmo, D., García-Olmo, D.C., Ontañón, J., and Martínez, E. (2000). Horizontal transfer of DNA and the “genomastasis hypothesis.” *Blood J.* *95*, 724–725.

García-Olmo, D., García-Olmo, D.C., Domínguez-Berzosa, C., Guadalajara, H., Vega, L., and García-Arranz, M. (2012). Oncogenic transformation induced by cell-free nucleic acids circulating in plasma (genomastasis) remains after the surgical resection of the primary tumor: a pilot study. *Expert Opin. Biol. Ther.* *12*, S61–S68.

García-Olmo, D.C., Domínguez, C., García-Arranz, M., Anker, P., Stroun, M., García-Verdugo, J.M., and García-Olmo, D. (2010). Cell-Free Nucleic Acids Circulating in the Plasma of Colorectal Cancer Patients Induce the Oncogenic Transformation of Susceptible Cultured Cells. *Cancer Res.* *70*, 560–567.

Giacona, M.B., Ruben, G.C., Iczkowski, K.A., Roos, T.B., Porter, D.M., and Sorenson, G.D. (1998). Cell-free Dna in Human Blood Plasma: Length Measurements in Patients with Pancreatic Cancer and Healthy Controls. *Pancreas* *17*, 89–97.

Ginkel, J.H. van, Broek, D.A. van den, Kuik, J. van, Linders, D., Weger, R. de, Willems, S.M., and Huibers, M.M.H. (2017). Preanalytical blood sample workup for cell-free DNA analysis using Droplet Digital PCR for future molecular cancer diagnostics. *Cancer Med.* *6*, 2297–2307.

Goebel, G., Zitt, M., Zitt, M., and Müller, H.M. (2005). Circulating Nucleic Acids in Plasma or Serum (CNAPS) as Prognostic and Predictive Markers in Patients with Solid Neoplasias. *Dis. Markers* *21*, 105–120.

Goodall, J., Mateo, J., Yuan, W., Mossop, H., Porta, N., Miranda, S., Perez-Lopez, R., Dolling, D., Robinson, D., Sandhu, S., et al. (2017). Circulating Free DNA to Guide Prostate Cancer Treatment with PARP Inhibition. *Cancer Discov.* *7*, 1006–1017.

Gormally, E., Hainaut, P., Caboux, E., Airoidi, L., Autrup, H., Malaveille, C., Dunning, A., Garte, S., Matullo, G., Overvad, K., et al. Amount of DNA in plasma and cancer risk: A prospective study. *Int. J. Cancer* *111*, 746–749.

Haber, D.A., and Velculescu, V.E. (2014). Blood-Based Analyses of Cancer: Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA. *Cancer Discov.* *4*, 650–661.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* *100*, 57–70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.

Harle, A., Gavaille, C., Bouché, O., Abdelghani, M., and Plaza, JE. (2019). cfDNA for accurate determination of RAS and BRAF mutations using OncoBEAM liquid biopsy in metastatic colorectal cancer patients: Results of the real-world multicentric ColoBEAM study.

Heitzer, E., Auer, M., Ulz, P., Geigl, J.B., and Speicher, M.R. (2013a). Circulating tumor cells and DNA as liquid biopsies. *Genome Med.* 5, 73.

Heitzer, E., Ulz, P., Belic, J., Gutsch, S., Quehenberger, F., Fischereider, K., Benezeder, T., Auer, M., Pischler, C., Mannweiler, S., et al. (2013b). Tumor-associated copy number changes in the circulation of patients with prostate cancer identified through whole-genome sequencing. *Genome Med.* 5, 30.

Herman, J.G., Graff, J.R., Myöhänen, S., Nelkin, B.D., and Baylin, S.B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9821–9826.

Hermine, O. (2018). Cancer : la prévention et le dépistage | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer.

Higgins, M.J., Jelovac, D., Barnathan, E., Blair, B., Slater, S., Powers, P., Zorzi, J., Jeter, S.C., Oliver, G.R., Fetting, J., et al. (2012). Detection of Tumor PIK3CA Status in Metastatic Breast Cancer Using Peripheral Blood. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 3462–3469.

Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., et al. (2011). High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Anal. Chem.* 83, 8604–8610.

Holdenrieder, S., and Stieber, P. (2004). Apoptotic markers in cancer. *Spec. Issue Recent Adv. Cancer Biomark.* 37, 605–617.

Holdenrieder, S., Von Pawel, J., Nagel, D., and Stieber, P. (2010). Long-term stability of circulating nucleosomes in serum. *Anticancer Res.* 30, 1613–1615.

Ilie, M., Long, E., Butori, C., Hofman, V., Coelle, C., Mauro, V., Zahaf, K., Marquette, C.H., Mouroux, J., Paterlini-Bréchet, P., et al. (2012). ALK-gene rearrangement: a comparative analysis on circulating tumour cells and tumour tissue from patients with lung adenocarcinoma. *Ann. Oncol.* 23, 2907–2913.

Ilie, M., Hofman, V., Long-Mira, E., Selva, E., Vignaud, J.-M., Padovani, B., Mouroux, J., Marquette, C.-H., and Hofman, P. (2014). "Sentinel" Circulating Tumor Cells Allow Early Diagnosis of Lung Cancer in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS ONE* 9.

INCA (2008). Guide chimio.

International Agency for Research on Cancer (2012). Fact Sheets by Cancer.

Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F.O., Hesch, R.-D., and Knippers, R. (2001). DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. *Cancer Res.* 61, 1659–1665.

Jiang, P., Chan, C.W.M., Chan, K.C.A., Cheng, S.H., Wong, J., Wong, V.W.-S., Wong, G.L.H., Chan, S.L., Mok, T.S.K., Chan, H.L.Y., et al. (2015). Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E1317–E1325.

Jung, R., Lübcke, C., Wagener, C., and Neumaier, M. (1997). Reversal of RT-PCR Inhibition Observed in Heparinized Clinical Specimens. *BioTechniques* 23, 24–28.

Kinde, I., Wu, J., Papadopoulos, N., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (2011). Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9530–9535.

Klein, E., Hubbell, E., Maddala, T., Aravanis, A., Beausang, J., Filippova, D., Gross, S., Jamshidi, A., Kurtzman, K., Shen, L., et al. (2018). Development of a comprehensive cell-free DNA (cfDNA) assay for early detection of multiple tumor types: The Circulating Cell-free Genome Atlas (CCGA) study. *J. Clin. Oncol.* 36, 1.

Lacave, R., Larsen, C.J., and Robert, J. (2005). *Cancérologie fondamentale* (John Libbey Eurotext).

Lam, N.Y.L., Rainer, T.H., Chiu, R.W.K., and Lo, Y.M.D. (2004). EDTA Is a Better Anticoagulant than Heparin or Citrate for Delayed Blood Processing for Plasma DNA Analysis. *Clin. Chem.* 50, 256–257.

Leary, R.J., Sausen, M., Kinde, I., Papadopoulos, N., Carpten, J.D., Craig, D., O'Shaughnessy, J., Kinzler, K.W., Parmigiani, G., Vogelstein, B., et al. (2012). Detection of Chromosomal Alterations in the Circulation of Cancer Patients with Whole-Genome Sequencing. *Sci. Transl. Med.* 4, 162ra154.

Lechaux, D., and Bouygues, V. (2019). Résection antérieure - ABCD Chirurgie.

Lecomte, T., Ceze, N., Dorval, É., and Laurent-Puig, P. (2010). Circulating free tumor DNA and colorectal cancer. </data/revues/03998320/v34i12/S0399832010002873/>.

Lee, T.-H., Montalvo, L., Chrebtow, V., and Busch, M.P. (2001). Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: Higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion (Paris)* 41, 276–282.

LEITNER, L. (2013). Etude d'un procédé de filtration membranaire à sélectivité variable et contrôlée utilisant des membranes de polydiméthylsiloxane en milieu organique : application à la séparation de peptides. Université de Lorraine.

Leon, S.A., Shapiro, B., Sklaroff, D.M., and Yaros, M.J. (1977). Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 37, 646–650.

Litchfield, K., Au, L., Swanton, C., and Turajlic, S. (2018). Representative sequencing: Profiling extreme tumor diversity. *Ann. Oncol.* 29.

Little, S. (2001). Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Curr. Protoc. Hum. Genet. Chapter 9, Unit 9.8.*

Liu, Q., and Sommer, S.S. (2004). Detection of extremely rare alleles by bidirectional pyrophosphorolysis-activated polymerization allele-specific amplification (Bi-PAP-A): measurement of mutation load in mammalian tissues. *BioTechniques* 36, 156–166.

Lo, Y.M., Zhang, J., Leung, T.N., Lau, T.K., Chang, A.M., and Hjelm, N.M. (1999). Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 218–224.

Lui, Y.Y.N., Chik, K.-W., Chiu, R.W.K., Ho, C.-Y., Lam, C.W.K., and Lo, Y.M.D. (2002). Predominant Hematopoietic Origin of Cell-free DNA in Plasma and Serum after Sex-mismatched Bone Marrow Transplantation. *Clin. Chem.* 48, 421–427.

Maheswaran, S., Sequist, L.V., Nagrath, S., Ulkus, L., Brannigan, B., Collura, C.V., Inserra, E., Diederichs, S., Iafrate, A.J., Bell, D.W., et al. (2008). Detection of Mutations in EGFR in Circulating Lung-Cancer Cells. *N. Engl. J. Med.* 359, 366–377.

Marchetti, A., Palma, J.F., Felicioni, L., Pas, T.M.D., Chiari, R., Grammastros, M.D., Filice, G., Ludovini, V., Brandes, A., Chella, A., et al. (2015). Early Prediction of Response to Tyrosine Kinase Inhibitors by Quantification of EGFR Mutations in Plasma of NSCLC Patients. *J. Thorac. Oncol.* 10, 1437–1443.

Marko, M.A., Chipperfield, R., and Birnboim, H.C. (1982). A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. *Anal. Biochem.* 121, 382–387.

Mauger, F., How-Kit, A., and Tost, J. (2017). COLD-PCR Technologies in the Area of Personalized Medicine: Methodology and Applications. *Mol. Diagn. Ther.* *21*, 269–283.

McBride, D.J., Orpana, A.K., Sotiriou, C., Joensuu, H., Stephens, P.J., Mudie, L.J., Hämäläinen, E., Stebbings, L.A., Andersson, L.C., Flanagan, A.M., et al. (2010). Use of Cancer-Specific Genomic Rearrangements to Quantify Disease Burden in Plasma from Patients with Solid Tumors. *Genes. Chromosomes Cancer* *49*, 1062–1069.

Merel, P. (2007). Automatisation et biologie moléculaire : de l'extraction des acides nucléiques à la PCR temps-réel. *6*.

Merenbakh-Lamin, K., Ben-Baruch, N., Yeheskel, A., Dvir, A., Soussan-Gutman, L., Jeselsohn, R., Yelensky, R., Brown, M., Miller, V.A., Sarid, D., et al. (2013). D538G Mutation in Estrogen Receptor- α : A Novel Mechanism for Acquired Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Cancer Res.* *73*, 6856–6864.

Messaoudi, S.E., Mouliere, F., Manoir, S.D., Bascoul-Mollevis, C., Gillet, B., Nouaille, M., Fiess, C., Crapez, E., Bibeau, F., Theillet, C., et al. (2016). Circulating DNA as a Strong Multimarker Prognostic Tool for Metastatic Colorectal Cancer Patient Management Care. *Clin. Cancer Res.* *22*, 3067–3077.

MicrobiologieMédicale (2016). Amplification génique par PCR en temps réel.

Mouliere, F., El Messaoudi, S., Gongora, C., Guedj, A.-S., Robert, B., Del Rio, M., Molina, F., Lamy, P.-J., Lopez-Crapez, E., Mathonnet, M., et al. (2013). Circulating Cell-Free DNA from Colorectal Cancer Patients May Reveal High KRAS or BRAF Mutation Load. *Transl. Oncol.* *6*, 319–328.

Muraki, Y., Kouji, B., Yanokura, M., Kobayashi, Y., Kawaguchi, M., Nomura, H., Hirasawa, A., Susumu, N., and Aoki, D. (2009). Epigenetic DNA hypermethylation: Clinical applications in endometrial cancer (Review).

Murtaza, M., Dawson, S.-J., Tsui, D.W.Y., Gale, D., Forshew, T., Piskorz, A.M., Parkinson, C., Chin, S.-F., Kingsbury, Z., Wong, A.S.C., et al. (2013). Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* *497*, 108–112.

Namer, M., Héry, M., Spielmann, M., and Gligorov, J. *Cancer du sein en situation métastatique. Compté-rendu du cours supérieur francophone de cancérologie* (Springer).

National Cancer Institute (2018). *Radiation Therapy*.

Newman, A.M., Bratman, S.V., To, J., Wynne, J.F., Eclov, N.C.W., Modlin, L.A., Liu, C.L., Neal, J.W., Wakelee, H.A., Merritt, R.E., et al. (2014). An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat. Med.* *20*, 548–554.

Newman, A.M., Lovejoy, A.F., Klass, D.M., Kurtz, D.M., Chabon, J.J., Scherer, F., Stehr, H., Liu, C.L., Bratman, S.V., Say, C., et al. (2016). Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA. *Nat. Biotechnol.* *34*, 547–555.

P. Mandel, and Metais, P. (1948). Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *Comptes Rendus Séances Société Biol. Ses Fil.* *142* (3-4).

Page, K., Guttery, D.S., Zahra, N., Primrose, L., Elshaw, S.R., Pringle, J.H., Blighe, K., Marchese, S.D., Hills, A., Woodley, L., et al. (2013). Influence of Plasma Processing on Recovery and Analysis of Circulating Nucleic Acids. *PLOS ONE* *8*, e77963.

Pécuchet, N., Rozenholc, Y., Zonta, E., Pietrasz, D., Didelot, A., Combe, P., Gibault, L., Bachet, J.-B., Taly, V., Fabre, E., et al. (2016). Analysis of Base-Position Error Rate of Next-Generation Sequencing to Detect Tumor Mutations in Circulating DNA. *Clin. Chem.* *62*, 1492–1503.

Peng, M., Chen, C., Hulbert, A., Brock, M.V., and Yu, F. (2017). Non-blood circulating tumor DNA detection in cancer. *Oncotarget* *8*, 69162–69173.

Perkins, G., Yap, T.A., Pope, L., Cassidy, A.M., Dukes, J.P., Riisnaes, R., Massard, C., Cassier, P.A., Miranda, S., Clark, J., et al. (2012). Multi-Purpose Utility of Circulating Plasma DNA Testing in Patients with Advanced Cancers. *PLOS ONE* *7*, e47020.

Precision System Science Co, Ltd (2017). Magtration Reagent - MagDEA Dx SV - Mode d'emploi.

Pruthi, S., Creagan, E., and Giridhar, K. (2017). Chemotherapy.

Reckamp, K.L., Melnikova, V.O., Karlovich, C., Sequist, L.V., Camidge, D.R., Wakelee, H., Perol, M., Oxnard, G.R., Kosco, K., Croucher, P., et al. (2016). A Highly Sensitive and Quantitative Test Platform for Detection of NSCLC EGFR Mutations in Urine and Plasma. *J. Thorac. Oncol.* *11*, 1690–1700.

Reinert, T., Schøler, L.V., Thomsen, R., Tobiasen, H., Vang, S., Nordentoft, I., Lamy, P., Kannerup, A.-S., Mortensen, F.V., Stribolt, K., et al. (2016). Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. *Gut* *65*, 625–634.

Riout, D. (2016). Equipements - Les cytomètres.

Rothwell, D.G., Ayub, M., Cook, N., Thistlethwaite, F., Carter, L., Dean, E., Smith, N., Villa, S., Dransfield, J., Clipson, A., et al. (2019). Utility of ctDNA to support patient selection for early phase clinical trials: the TARGET study. *Nat. Med.* *25*, 738–743.

Sanmamed, M.F., Fernández-Landázuri, S., Rodríguez, C., Zárata, R., Lozano, M.D., Zubiri, L., Perez-Gracia, J.L., Martín-Algarra, S., and González, A. (2015). Quantitative Cell-Free Circulating BRAFV600E Mutation Analysis by Use of Droplet Digital PCR in the Follow-up of Patients with Melanoma Being Treated with BRAF Inhibitors. *Clin. Chem.* *61*, 297–304.

Schwarzenbach, H., Alix-Panabières, C., Müller, I., Letang, N., Vendrell, J.-P., Rebillard, X., and Pantel, K. (2009). Cell-free Tumor DNA in Blood Plasma As a Marker for Circulating Tumor Cells in Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* *15*, 1032.

Schwarzenbach, H., Hoon, D.S.B., and Pantel, K. (2011). Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 426–437.

Schwarzenbach Heidi, Chun Felix K.-H., Lange Imke, Carpenter Sebastian, Gottberg Miriam, Erbersdobler Andreas, Friedrich Martin G., Huland Hartwig, and Pantel Klaus (2007). Detection of tumor-specific DNA in blood and bone marrow plasma from patients with prostate cancer. *Int. J. Cancer* *120*, 1465–1471.

SCOAZEC, J.-Y. (1997). La mort des cellules hépatiques. *4*, 45–57.

Sequist, L.V., Waltman, B.A., Dias-Santagata, D., Digumarthy, S., Turke, A.B., Fidias, P., Bergethon, K., Shaw, A.T., Gettinger, S., Cospers, A.K., et al. (2011). Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Sci. Transl. Med.* *3*, 75ra26-75ra26.

Shah, S.P., Roth, A., Goya, R., Oloumi, A., Ha, G., Zhao, Y., Turashvili, G., Ding, J., Tse, K., Haffari, G., et al. (2012). The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple negative breast cancers. *Nature* *486*.

Sorber, L., Zwaenepoel, K., Deschoolmeester, V., Royen, G., Lardon, F., Rolfo, C., and Pauwels, P. (2016). A comparison of Cell-Free DNA Isolation Kits. *J. Mol. Diagn.*

Sorenson, G. (1997). Communication at the XXVth anniversary meeting of the international society for oncodevelopmental biology and medicine. Montreux Switz. Sept.

Sorenson, G.D., Pribish, D.M., Valone, F.H., Memoli, V.A., Bzik, D.J., and Yao, S.L. (1994). Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol. Biomark. Amp Prev.* *3*, 67.

Sozzi, G., Roz, L., Conte, D., Mariani, L., Andriani, F., Verderio, P., and Pastorino, U. (2005). Effects of Prolonged Storage of Whole Plasma or Isolated Plasma DNA on the Results of Circulating DNA Quantification Assays. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *97*, 1848–1850.

Ståhlberg, A., Krzyzanowski, P.M., Jackson, J.B., Egyud, M., Stein, L., and Godfrey, T.E. (2016). Simple, multiplexed, PCR-based barcoding of DNA enables sensitive mutation detection in liquid biopsies using sequencing. *Nucleic Acids Res.* *44*, e105.

Stanford Health Care Types of surgery for cancer treatment.

Stroun, M., Anker, P., Lyautey, J., Lederrey, C., and Maurice, P.A. (1987). Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* *23*, 707–712.

Stroun, M., Anker, P., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C., and Beljanski, M. (1989). Neoplastic Characteristics of the DNA Found in the Plasma of Cancer Patients. *Oncology* *46*, 318–322.

Stroun, M., Lyautey, J., Lederrey, C., Olson-Sand, A., and Anker, P. (2001). About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release. *Proc. Chin. Congr. Clin. Chem. Lab. Med.* *2000 313*, 139–142.

Swanton, C. (2012). Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. *Cancer Res.* *72*, 4875–4882.

Swinkels, D.W., Wiegerinck, E., Steegers, E.A.P., and de Kok, J.B. (2003). Effects of Blood-Processing Protocols on Cell-free DNA Quantification in Plasma. *Clin. Chem.* *49*, 525.

Taly, V., Pekin, D., Benhaim, L., Kotsopoulos, S.K., Corre, D.L., Li, X., Atochin, I., Link, D.R., Griffiths, A.D., Pallier, K., et al. (2013). Multiplex Picodroplet Digital PCR to Detect KRAS Mutations in Circulating DNA from the Plasma of Colorectal Cancer Patients. *Clin. Chem.* *59*, 1722–1731.

Tang, X., Morris, S.L., Langone, J.J., and Bockstahler, L.E. (2005). Microarray and allele specific PCR detection of point mutations in *Mycobacterium tuberculosis* genes associated with drug resistance. *J. Microbiol. Methods* *63*, 318–330.

Taniguchi, K., Uchida, J., Nishino, K., Kumagai, T., Okuyama, T., Okami, J., Higashiyama, M., Kodama, K., Imamura, F., and Kato, K. (2011). Quantitative Detection of EGFR Mutations in Circulating Tumor DNA Derived from Lung Adenocarcinomas. *Clin. Cancer Res.* *17*, 7808–7815.

Thierry, A.R., Mouliere, F., Gongora, C., Ollier, J., Robert, B., Ychou, M., Del Rio, M., and Molina, F. (2010). Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Res.* *38*, 6159–6175.

Thierry, A.R., Mouliere, F., Messaoudi, S.E., Mollevi, C., Lopez-Crapez, E., Rolet, F., Gillet, B., Gongora, C., Dechelotte, P., Robert, B., et al. (2014). Clinical validation of the detection of *KRAS* and *BRAF* mutations from circulating tumor DNA. *Nat. Med.* *20*, 430–435.

- Thierry, A.R., El Messaoudi, S., Gahan, P.B., Anker, P., and Stroun, M. (2016). Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev.* 35, 347–376.
- Thierry, A.R., El Messaoudi, S., Mollevi, C., Raoul, J.L., Guimbaud, R., Pezet, D., Artru, P., Assenat, E., Borg, C., Mathonnet, M., et al. (2017). Clinical utility of circulating DNA analysis for rapid detection of actionable mutations to select metastatic colorectal patients for anti-EGFR treatment. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 28, 2149–2159.
- Tie, J., Kinde, I., Wang, Y., Wong, H.L., Roebert, J., Christie, M., Tacey, M., Wong, R., Singh, M., Karapetis, C.S., et al. (2015). Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 26, 1715–1722.
- Tie, J., Wang, Y., Tomasetti, C., Li, L., Springer, S., Kinde, I., Silliman, N., Tacey, M., Wong, H.-L., Christie, M., et al. (2016). Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci. Transl. Med.* 8, 346ra92.
- Tsimberidou, A.-M. (2015). TARGETED THERAPY IN CANCER. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 76, 1113–1132.
- Tsui, D.W.Y., and Berger, M.F. (2016). Profiling Non–Small Cell Lung Cancer: From Tumor to Blood. *Clin. Cancer Res.* 22, 790–792.
- Ugozzoli, L., and Wallace, R.B. (1991). Allele-specific polymerase chain reaction. *Methods* 2, 42–48.
- Underhill, H.R., Kitzman, J.O., Hellwig, S., Welker, N.C., Daza, R., Baker, D.N., Gligorich, K.M., Rostomily, R.C., Bronner, M.P., and Shendure, J. (2016). Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLOS Genet.* 12, e1006162.
- Vallée, A., Marcq, M., Bizieux, A., Kouri, C.E., Lacroix, H., Bennouna, J., Douillard, J.-Y., and Denis, M.G. (2013). Plasma is a better source of tumor-derived circulating cell-free DNA than serum for the detection of EGFR alterations in lung tumor patients. *Lung Cancer* 82, 373–374.
- Van Der Vaart Maniesh, and Pretorius Piet J. (2008). Circulating DNA. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1137, 18–26.
- Vasioukhin Valeri, Anker Philippe, Maurice Pierre, Lyautey Jacqueline, Lederrey Christine, and Stroun Maurice (1994). Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br. J. Haematol.* 86, 774–779.

Voelkerding, K.V., Dames, S., and Durtschi, J.D. (2010). Next Generation Sequencing for Clinical Diagnostics-Principles and Application to Targeted Resequencing for Hypertrophic Cardiomyopathy. *J. Mol. Diagn. JMD* 12, 539–551.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., and Kinzler, K.W. (2013). Cancer Genome Landscapes. *Science* 339, 1546–1558.

Wong, T.-S., Kwong, D.L.-W., Sham, J.S.-T., Wei, W.I., Kwong, Y.-L., and Yuen, A.P.-W. (2004). Quantitative Plasma Hypermethylated DNA Markers of Undifferentiated Nasopharyngeal Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 10, 2401.

Wu, T.-L., Zhang, D., Chia, J.-H., Tsao, K.-C., Sun, C.-F., and Wu, J.T. (2002). Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin. Chim. Acta* 321, 77–87.

Wyatt, A.W., Annala, M., Aggarwal, R., Beja, K., Feng, F., Youngren, J., Foye, A., Lloyd, P., Nykter, M., Beer, T.M., et al. (2018). Concordance of Circulating Tumor DNA and Matched Metastatic Tissue Biopsy in Prostate Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 110, 78–86.

Xue, X., Teare, M.D., Holen, I., Zhu, Y.M., and Woll, P.J. (2009). Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. *Clin. Chim. Acta* 404, 100–104.

Yachida, S., Jones, S., Bozic, I., Antal, T., Leary, R., Fu, B., Kamiyama, M., Hruban, R.H., Eshleman, J.R., Nowak, M.A., et al. (2010). Distant Metastasis Occurs Late during the Genetic Evolution of Pancreatic Cancer. *Nature* 467, 1114–1117.

Yip, C.K., Murata, K., Walz, T., Sabatini, D.M., and Kang, S.A. (2010). Structure of the human mTOR Complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Mol. Cell* 38, 768–774.

Zhai, R.-L., Xu, F., Zhang, P., Zhang, W.-L., Wang, H., Wang, J.-L., Cai, K.-L., Long, Y.-P., Lu, X.-M., Tao, K.-X., et al. (2016). The Diagnostic Performance of Stool DNA Testing for Colorectal Cancer. *Medicine (Baltimore)* 95.

Zinkova, A., Brynychova, I., Svacina, A., Jirkovska, M., and Korabecna, M. (2017). Cell-free DNA from human plasma and serum differs in content of telomeric sequences and its ability to promote immune response. *Sci. Rep.* 7, 2591.

Zumbo, paul (2016). Ethanol Precipitation. 12.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 03 Février 2020

<p align="center">DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>présenté par : Lauranne ROGERAT</p> <p>Sujet : Intérêt de l'ADN tumoral circulant dans la prise en charge clinique des cancers : dépistage, diagnostic, suivi de traitement et risque de récurrence</p> <p>Jury :</p> <p>Président : M. Jean-Louis MERLIN, Maître de Conférences Directeur : M. Alexandre HARLE, Professeur Juges : Mme Céline GAVOILLE, Oncologue M. Alain RUPIN, Pharmacien</p>	<p align="center">Vu, Nancy, le 23/12/2019</p> <p align="center">Le Président du Jury Directeur de Thèse</p> <p align="center">M. Jean-Louis Merlin M. Alexandre Harlé</p> <p align="center">   </p>
<p align="center">Vu et approuvé, Nancy, le 17.01.2020</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center">  <i>Pr. Raphaël REVAL</i> </p>	<p align="center">Vu, Nancy, le 23.01.2020</p> <p align="center">Le Président de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center">  <i>Pierre MUTZENHARDT</i> </p> <p align="center">N° d'enregistrement : 11052</p>

N° d'identification :

TITRE

INTERET DE L'ADN TUMORAL CIRCULANT DANS LA PRISE EN CHARGE CLINIQUE DES CANCERS : DEPISTAGE, DIAGNOSTIC, SUIVI DE TRAITEMENT ET RISQUE DE RECIDIVE.

Thèse soutenue le 03 février 2020

Par Lauranne ROGERAT

RESUME :

Les cancers sont actuellement la deuxième cause de mortalité dans le monde, l'amélioration de leur prise en charge et des traitements sont devenus des enjeux majeurs de santé publique. La détection de mutations somatique est devenue une étape systématique pour la réalisation de ces objectifs afin d'orienter, si possible, vers des thérapies ciblées.

Dans cette continuité, l'ADN tumoral circulant est une avancée majeure : en plus de la concordance des résultats entre la biopsie tumorale et la biopsie liquide, démontrée dans de nombreuses études, d'autres avantages tels que la rapidité des résultats, le caractère non invasif du prélèvement, la réduction du coût d'analyse.

De nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer les meilleures conditions pré-analytiques pour obtenir les résultats les plus fiables et reproductibles. D'autres sont venues étayer ces connaissances en démontrant les différents usages de l'ADN tumoral circulant, prouvant ainsi l'intérêt de son utilisation dans le diagnostic, comme marqueur théranostique, dans le monitoring, dans le pronostic et même dans le dépistage.

Avec les avantages que présente l'ADN tumoral circulant par rapport à la biopsie tumorale, notamment sa demi-vie, il serait intéressant de l'utiliser dans les essais cliniques afin d'évaluer au plus vite l'efficacité ou non du traitement testé lors de l'essai, ce qui permettrait, dans le cas d'une efficacité, une mise sur le marché plus rapide pour traiter l'ensemble des patients.

MOTS CLES : ADN tumoral circulant – cancer – essai clinique – prise en charge

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Alexandre HARLE	Institut de Cancérologie de Lorraine	Expérimentale <input type="checkbox"/> Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/> Thème <input checked="" type="checkbox"/>

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle