Marqueurs de réponse aux thérapies ciblées et personnalisation thérapeutique dans les cancers colorectaux métastatiques

Alexandre Harlé

▶ **To cite this version:**

Alexandre Harlé. Marqueurs de réponse aux thérapies ciblées et personnalisation thérapeutique dans les cancers colorectaux métastatiques. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0267 . tel-01100524v1

HAL Id: tel-01100524

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01100524v1

Submitted on 29 Mar 2018 (v1), last revised 6 Jan 2015 (v2)

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-theses-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

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Alexandre HARLÉ

Marqueurs de réponse aux thérapies ciblées et personnalisation thérapeutique dans les cancers colorectaux métastatiques

Le 13 Novembre 2014

Membres du jury :

Rapporteurs :	**Pr. L'Houcine OUAFIK, PU-PH**	**Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille**
	Pr. Jean-Christophe SABOURIN, PU-PH	**Centre Hospitalier Universitaire de Rouen**
Examinateurs :	**Pr. Jean-François EMILE, PU-PH**	**Hôpital Ambroise Paré, Boulogne**
	Pr. Jean-Yves JOUZEAU, PU-PH	**Centre Hospitalier Universitaire de Nancy**
	Pr. Pierre LAURENT-PUIG, PU-PH	**Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris**
	Pr. Jean-Louis MERLIN, PU-PH	**Institut de Cancérologie de Lorraine, Nancy, Directeur de Thèse**

CNRS UMR 7039 CRAN, Département SBS
Campus Sciences - BP 70239 - 54506 VANDOEUVRE Cedex

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude envers les membres de mon jury de thèse :

À mon Maître et Directeur de Thèse, Monsieur le Professeur Jean-Louis MERLIN

Je vous remercie de m'avoir accueilli lors de mes deux premiers semestres en tant qu'interne en Pharmacie, puis de m'avoir encadré pour mon Master 2. J'ai le plaisir et l'honneur de travailler depuis 3 ans à l'Unité de Biologie des Tumeurs en tant qu'assistant hospitalo-universitaire sous votre direction, et je tiens à vous exprimer ma plus sincère gratitude pour vos conseils, votre patience, votre confiance, votre disponibilité et votre bienveillance à mon égard. Vous m'avez appris tout ce que je sais dans le domaine de la biologie moléculaire, ce travail n'aurait jamais pu voir le jour sans vous et votre soutien. Veuillez-trouver ici l'assurance de mon plus profond respect.

À Monsieur le Professeur L'Houcine OUAFIK

Je vous remercie de me faire l'honneur d'être rapporteur afin de juger mon travail. Merci pour votre gentillesse et pour la qualité de nos échanges au cours des différentes manifestations auxquelles j'ai toujours plaisir à vous rencontrer. Veuillez-trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.

À Monsieur le Professeur Jean-Christophe SABOURIN

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Votre présence représente pour moi l'opportunité de voir mon travail jugé du point de vue de l'anatomo-pathologiste. Veuillez-trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance.

À Monsieur le Professeur Jean-François EMILE

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et d'apporter votre expertise dans le domaine de l'anatomopathologie, mais aussi de l'évaluation de la qualité dans les laboratoires de Biopathologie. Veuillez-trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

À Monsieur le Professeur Jean-Yves JOUZEAU

Je vous remercie d'avoir accepté aussi spontanément de juger mon travail. Je tiens également à vous remercier sincèrement pour vos conseils, votre soutien et votre bienveillance à mon égard durant l'ensemble de mon internat et encore aujourd'hui en tant que jeune enseignant de la faculté de Pharmacie de Nancy. Veuillez-trouver ici l'expression de mon profond respect.

À Monsieur le Professeur Pierre LAURENT-PUIG

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. C'est pour moi un véritable honneur de voir mon travail jugé par l'un des experts reconnu mondialement dans le domaine de la biologie moléculaire des cancers colorectaux métastatiques. Veuillez-trouver ici l'expression de toute ma gratitude.

Ensuite, je voudrais témoigner ma plus sincère reconnaissance à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce travail :

Au Directeur de l'UMR 7039 CRAN, Monsieur le Professeur Didier Wolf
Je vous remercie de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans votre laboratoire. Veuillez-trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

À Madame le Doyen de la Faculté de Pharmacie de Nancy, Madame le Professeur Francine Paulus
Je suis heureux d'enseigner à la Faculté de de Pharmacie, je vous remercie sincèrement pour votre soutien et votre bienveillance. Veuillez-trouver ici l'expression de toute ma gratitude.

À Monsieur le Directeur de l'Institut de Cancérologie de Lorraine, Monsieur le Professeur Thierry Conroy
Je vous remercie de me permettre d'exercer au sein de l'Institut de Cancérologie de Lorraine. Veuillez-trouver ici l'expression de toute ma gratitude.

À mes collègues de travail de l'Unité de Biologie des Tumeurs de l'Institut de Cancérologie de Lorraine
Je vous remercie de m'avoir soutenu et supporté pendant toutes ces années ! Je suis chanceux de travailler avec vous qui êtes des personnes de grande qualité, aussi bien sur le plan professionnel que humain. Je suis heureux de pouvoir travailler et échanger avec vous jour après jour.

Aux Docteurs Nicolas Gambier et Julien Scala-Bertola
J'ai eu le plaisir de travailler pendant un an à vos côtés au laboratoire de Toxicologie Pharmacologie. Merci pour vos encouragements, votre aide et vos conseils. Je suis heureux et chanceux de vous compter parmi mes amis.

À Julia Salleron
Je te remercie sincèrement pour tes compétences professionnelles et humaines ainsi que pour toute l'aide que tu m'as apportée pour traiter l'aspect statistique de ce travail. Je me réjouie sincèrement de nos futures collaborations.

À mes amis
Je vous remercie vous tous, pour votre soutien. Je suis chanceux d'être entouré par des gens sincères et sur lesquels je sais toujours pouvoir compter.

À mes parents et ma famille
Je vous remercie pour votre amour et votre inconditionnel soutien depuis toujours et ce malgré la distance qui parfois nous sépare.

Avant-Propos

Ce travail de thèse a été effectué durant mes trois premières années en tant qu'assistant hospitalo-universitaire des disciplines pharmaceutiques à l'Unité de Biologie des Tumeurs du Professeur Jean-Louis MERLIN, Institut de Cancérologie de Lorraine, au sein de l'unité de recherche CNRS UMR 7039 CRAN, Université de Lorraine.

Ce travail a donné lieu aux publications et communications suivantes :

Publications :

Périodiques internationaux à comité de lecture

[1] Harlé A., Rouyer M., Harter V., Genin P., Leroux A., Merlin J.L Comparison of COBAS 4800 KRAS, TaqMan PCR and High Resolution Melting PCR assays for the detection of KRAS somatic mutations in formalin-fixed paraffin embedded colorectal tumors. *Virchows Archives. 2013 Mar;462(3):329-35.*

[2] Harlé A., Lion M., Lozano N., Husson M., Harter V., Genin P., Merlin J.L. PIK3CA exon 9 and 20 mutations analysis of breast cancers using PCR HRM and PCR ARMS: Relation with clinicopathologic criteria. *Oncology Reports. 2013 Mar;29(3):1043-52.*

[3] Chretien A.S., **Harlé A.**, Meyer-Lefebvre M., Rouyer M., Husson M., Ramacci C., Leroux A., Genin P., Merlin J.L. Optimization of routine KRAS mutation testing procedure for rational individualized first line targeted therapy selection in metastatic colorectal cancer. *Cancer Medicine. 2013 Feb, Vol. 2(1):11-20*

Périodiques nationaux à comité de lecture

[4] Harlé A., Dubois C., Rouyer M., Merlin J.L. Validation de méthode selon la norme ISO 15189 et le SH GTA 04 : Application à la détection des mutations KRAS par méthode TaqMan. *Annales de Biologie Clinique. 2013 Oct 1 ;71(5):603-607*

[5] Harlé A., Lion M., Husson M., Dubois C., Merlin J.L. Validation de méthode selon la norme ISO 15189 et le SH GTA 04 : Application à l'extraction et au dosage quantitatif de l'ADN par méthode spectrophotométrique. *Annales de Biologie Clinique. 2013 Oct 1;71(5):608-614*

[6] Harlé A., Merlin J.L. Biomarqueurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées en oncologie. *Annales de Biologie Clinique. 2013 Nov 1;71:89-97*

Communications Affichées :

[1] Harlé A., Lion M., Rouyer R., Lozano N., Merlin J.L. Comparative evaluation of three real-time PCR assays for the detection of *PIK3CA* somatic mutations in formalin-fixed paraffin embedded breast carcinomas. *AACR Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 19 au 23 Octobre 2013, Boston, MA*

[2] Harlé A., Lion M., Lozano N., Husson M., Harter V., Genin P., Merlin J.L. *PIK3CA* exon 9 and 20 mutations analysis of breast cancers using PCR-HRM and PCR ARMS : Relation with clinicopathologic criteria. *14èmes journées du GPCO, 15 et 16 Novembre 2012, Paris*

[3] Harlé A., Merlin J.L. Comparaison des techniques COBAS KRAS 4800 et PCR TaqMan pour la détection des mutations somatiques du gène *KRAS* - Application dans le processus d'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme ISO 15189. *14èmes journées du GPCO, 15 et 16 Novembre 2012, Paris*

[4] Harlé A., Merlin J.L. Comparison of COBAS 4800 KRAS, PCR TaqMan and PCR High Resolution Melting assays for the detection of *KRAS* somatic mutations in Formalin Fixed Paraffin Embedded colorectal tumors. *ASCO EORTC NCI Markers In Cancer 2012, 11 au 13 Octobre 2012, Miami, FL, J Clin Oncol 30: 2012 (suppl 30; abstr 103)*

[5] Harlé A., Lozano N., Lion M., Husson M., Rouyer M., Ramacci C., Genin P., Merlin J.L. Highly sensitive determination of *PIK3CA* exon 9 and 20 hotspot mutations in breast tumors. *ASCO annual meeting 2012, 1er au 5 Juin 2012, Chicago, IL, J Clin Oncol 30, 2012 (suppl; abstr TPS10634)*

[6] Harlé A., Lozano N., Nicolaizeau C., Chrétien A.S., Husson M., Ramacci C., Rouyer M., Genin P., Leroux A., Merlin J.L. Validation of two methods of detection of *PIK3CA* mutations on exons 9 and 20 by PCR-HRM and real-time PCR-ARMS Scorpion assay. *2ème Colloque Inter-Régional Grand-Est de Recherche Translationnelle en Oncologie OncoTrans 2011, 8 et 9 Septembre 2011, Nancy*

[7] Chretien A.S., **Harlé A.**, Meyer-Lefebvre M., Rouyer M., Husson M., Ramacci C., Leroux A., Genin P., Merlin J.L. Optimization of routine *KRAS* mutation testing procedure for rational individualized first line targeted therapy selection in metastatic colorectal cancer. *2ème Colloque Inter-Régional Grand-Est de Recherche Translationnelle en Oncologie OncoTrans 2011, 8 et 9 Septembre 2011, Nancy*

Table des matières

Remerciements .....

Avant-Propos .....

Liste des figures I

Liste des tableaux II

Liste des abréviations III

Introduction générale 1

Chapitre I 4

I. Introduction bibliographique et objectifs du travail 5

I.1. Le cancer colorectal métastatique 5

I.1.1. Généralités sur le cancer colorectal métastatique 5

I.1.2. Evolution des traitements du cancer colorectal métastatique 7

I.1.2.1. Les chimiothérapies cytotoxiques traditionnelles 8

I.1.2.2. Anticorps monoclonaux, protéines de fusion recombinantes et inhibiteurs de kinases utilisés dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques 9

I.1.2.2.1. Le panitumumab 10

I.1.2.2.2. Le cetuximab 12

I.1.2.2.3. Le bevacizumab 13

I.1.2.2.4. L'aflibercept 14

I.1.2.2.5. Le regorafenib 15

I.1.3. Intérêt de l'évolution des traitements sur la survie globale chez les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique 15

I.2. Signalisation cellulaire dans les cancers colorectaux 17

I.2.1. Les récepteurs HER 18

I.2.1.1. HER 1 ou EGFR 19

I.2.1.2. HER 2 21

I.2.1.3. HER 3 22

I.2.1.4. HER 4 23

I.2.1.5. Mécanismes d'activation 23

I.2.2. Voie des MAPKinases 26
I.2.3. Voie PI3K AKT mTOR 28
I.3. Génétique somatique dans les cancers colorectaux métastatiques et implication dans la résistance aux thérapies anti-EGFR 31
I.3.1. Mutations des gènes *KRAS* et *NRAS* 31
I.3.2. Mutations du gènes *BRAF* 33
I.3.3. Mutations du gène *PIK3CA* 34
I.3.4. Plateformes de génétique moléculaire labellisées INCa 35
I.4. Objectifs du travail 39

Chapitre II 40

II. Intérêts des biomarqueurs en cancérologie et validation des techniques de biologie moléculaire pour la détection des mutations somatiques des gènes *RAS* et *PIK3CA* 41

II.1. Biomarqueurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées en oncologie 43
II.2. Optimisation des tests de PCR de routine pour le génotypage du gène *KRAS* pour une prescription rationnelle et individualisée des thérapies ciblées en première ligne dans les cancers colorectaux métastatiques 54
II.3. Comparaison des techniques Cobas 4800 KRAS, PCR TaqMan, PCR HRM pour la détection des mutations du gène KRAS dans des échantillons de carcinomes colorectaux fixés au formol et inclus en paraffine 67
II.4. Analyse des exons 9 et 20 du gène *PIK3CA* dans les cancers du sein par techniques PCR HRM et PCR ARMS : Corrélations avec les critères clinico-pathologiques 77

Chapitre III 90

III. Importance de la validation selon la norme ISO 15 189 pour le passage de la recherche à la routine diagnostique 91

III.1. Validation de méthode selon la norme ISO 15189 et le SH GTA 04 : Application à l'extraction et au dosage quantitatif de l'ADN par méthode spectrophotométrique 92
III.2. Validation de méthode selon la norme ISO 15 189 et le SH-GTA-04, Application à la détection des mutations *KRAS* par méthode TaqMan 102

Chapitre IV 109

IV. Nouveaux biomarqueurs prédictifs de résistance aux anti-EGFR, étude au niveau des gènes et étude de l'expression des phosphoprotéines en aval des voies RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT/mTOR 110

Chapitre V 131

V. Discussion générale 132

V.1. Biomarqueurs et Recherche translationnelle 132

V.2. Discussion sur le travail de thèse et applications cliniques des résultats 135

V.3. Les autres voies de signalisation à considérer 141

V.3.1. La voie des WNT 141

V.3.2. La voie STAT 142

V.3.3. P38MAPK 143

V.4. Les nouveaux biomarqueurs 144

V.4.1. ADN tumoral circulant 144

V.4.2. Cellules tumorales circulantes 145

V.4.3. Les microARNs 145

V.5. Evolution des techniques en biologie moléculaire 146

Conclusion 149

Annexes 153

Annexe 1 : Expression and activation of P38 MAP kinase in invasive ductal breast cancers : Correlation with expression of the estrogen receptor, HER2 ans downstream signaling phosphorylated proteins 154

Annexe 2 : ADN tumoral circulant, Chapitre 11, « Les biomarqueurs en Oncologie », Pr. JL Merlin, Springer, Paris, 2014. 160

Références Bibliographiques 169

Liste des figures

Figure 1 Les 10 processus de la maladie cancéreuse selon Hanahan et Weinberg (4). 2

Figure 2 Anatomie du système digestif. *D'après « Cancer colorectal : Un guide pour les patients » - ESMO 2013*. 5

Figure 3 Evolution de la survie globale de 1976 à nos jours des patients atteints de cancers colorectaux métastatiques 16

Figure 4 Récepteurs à activité tyrosine kinase. D'après J. Robert (47) 17

Figure 5 Les récepteurs HER et leurs ligands. D'après J. Robert (47) 18

Figure 6 Homo et hétérodimères pouvant être formés avec les 4 types de récepteurs HER. *D'après une illustration GSK Oncology* 25

Figure 7 La fixation de son ligand par le récepteur va permettre sa dimérisation et l'activation d'activité kinase. *D'après une illustration GSK Oncology* 25

Figure 8 La phosphorylation du GDP en GTP de la protéine RAS. D'après Pettersen *et al* (103) 27

Figure 9 La Voie des MAPKinases. D'après J. Robert (47) 28

Figure 10 La voie PI3K/AKT/mTOR. *D'après J. Robert* (47) 30

Figure 11 Les sites de liaison au GTP de KRAS. D'après Pettersen *et al* (103) . 32

Figure 12 Répartition des « nouvelles » mutations de KRAS et NRAS selon les différentes études cliniques publiées à ce jour. D'après Sorich *et al.* (27). 33

Figure 13 Proposition de workflow pour l'organisation des plateformes de génétique moléculaire réalisant des génotypages de *RAS*. 137

Figure 14 Illustration de l'hétérogénéité tumorale sur une coupe HES d'un prélèvement de cancer colorectal. D'après West N.P. et *al.* (139) 140

Figure 15 Informations concernant l'ADN, ajoutées chaque année dans les bases de données mondiales entre 1971 et 2011. D'après Wiechers *et al.* (161) 146

Liste des tableaux

Tableau 1 7ème classification TNM pour les cancers colorectaux, d'après Sobin *et al.* (12) et du Guide Affection Longue Durée de l'HAS et l'INCa « Tumeur maligne, Affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique – Cancer colorectal, Adénocarcinome », Janvier 2012. 6

Tableau 2 Classification en stades des cancers colorectaux. D'après Sobin *et al.* (12) et du Guide Affection Longue Durée de l'HAS et l'INCa « Tumeur maligne, Affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique – Cancer colorectal, Adénocarcinome », Janvier 2012. 7

Tableau 3 Liste des biomarqueurs validés par l'Institut National du Cancer.. 133

Liste des abréviations

4EBP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
5-FU	5-Fluorouracile
ABL1	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ABL2	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2
AcSé	Accès sécurisé à des thérapies ciblées innovantes
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFA	Acide, Formol, Alcool
AKT	Protéine kinase B
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
AMPK	5' AMP-activated Protein Kinase
ANGPT	Angiopoïétine
anti-EGFR	Médicament ciblant les récepteurs à l'EGF
AREG	Amphiréguline
ARF	Alternate Reading Frame
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
ARN	Acide Ribonucléique
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATP	Adénosine Triphosphate
β-Cat	Beta caténine
BAD	Bcl-2-Associated Death promoter
BCR-ABL	Breakpoint Cluster Region - Abelson
Beva	Bevacizuab
BPA	Bioplex Protein Array
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
BTC	Betacellulin
CA 19-9	Carbohydrate Hydrogen 19-9
Campto	Irinotécan
CASP9	Caspase 9
CCND1	Cycline D1
CDK1	Cyclin-Dependent Kinase 1
CE-IVD	Communauté Européénne - In vitro Diagnostic

C-erbB	HER
Cetux	Cetuximab
CISH	Chromogenic *in situ* Hybridization
COFRAC	Comité Français d'Accréditation
COSMIC	Catalog Of Somatic Mutations in Cancer
COX-2	Cyclo-oxygénase de type 2
CTC	Cellule Tumorale Circulante
ctDNA	ADN tumoral circulant
Cyt1	Cytokenesis Defective 1
Cyt2	Cytokenesis Defective 2
DDR	Discoidin domain receptor family ou CD 167
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFL7	EGF-like domain-containing protein 7
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELF4E	Eukaryotic initiation factor eIF4E like protein
ELK1	ETS domain-containing protein Elk-1
EMA	European Medicines Agency
EPG	Epiréguline
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FISH	Fluorescence *in situ* Hybridization
FLT3	Fms-Like Tyrosine Kinase 3
FLT3LG	Fms-related Tyrosine kinase 3 Ligand
FOLFIRI	5-Fluorouracile, Acide Folinique, Irinotécan
FOLFIRINOX	5-Fluorouracile, Acide Folinique, Irinotécan, Oxaliplatine
FOLFOX	5-Fluorouracile, Acide Folinique, Oxaliplatine
FOLFOXIRI	5-Fluorouracile, Acide Folinique, Oxaliplatine, Irinotécan
FoxO	Forkhead box O
FUFOL	5-Fluorouracile, Acide Folinique
GAS6	Growth Arrest-Specific 6
GDNF	Glial cell-Derived Neurotrophic Factor
GDP	Guanosine diphosphate

GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GPCR	Protéine couplée à une protéine G
GRB2	Growth factor Receptor-Bound protein 2
GRB7	Growth factor Receptor-Bound protein 3
GSK-3β	Glycogen Synthase Kinase 3 beta
GTP	Guanosine Triphosphate
HBEGF	Heparin-Binding EGF-like Growth Factor
Hsp90	Heat shock protein 90
HER	Human Epidermal Receptor
HGF	Hepatocyte growth factor
HIF	Hypoxia-Inducible Factors
HR	Hazard Ratio
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HRM	High Resolution Melting
IGF	Insulin-like Growth Factor
IgG	Immunoglobuline G
INCa	Institut National du Cancer
ISO	International Organization for Standardization
IκB	IκB Kinase
IL-6	Interleukine 6
IL-15	Interleukine 15
IL-23	Interleukine 23
JAK	Janus Kinase
JMa	Juxtamembrane isoform a
JMb	Juxtamembrane isoform b
JNK	c-Jun NH(2)-terminal kinase
kDa	kilo Dalton
KIT	V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog ou CD117 ou c-Kit
KITLG	KIT Ligand
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LBM	Laboratoire de Biologie Médicale
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
LTK	Leukocyte receptor tyrosine
LV5	Leucovorin (Acide folinique)

LV5/FU2	Leucovorin, 5-Fluorouracile
MAP	Mitogen-Activated Protein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MET	Hepatocyte Growth Factor Receptor (Synonyme HGFR)
miR 126	micro ARN 126
MK	MAPKinases
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
NFκB	Nuclear Factor-kappa B
NGF	Nerve growth factor
NRAS	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
NRG1	Neuregulin 1
NRG2	Neuregulin 2
NRG3	Neuregulin 3
NRG4	Neuregulin 4
NTRK	Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase
OR	Odd Ratio
ORL	Otho-Rhino-Laryngologie
ORR	Overall Response Rate
OS	Overall Survival
P110	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, sous-unité catalytique alpha
P21/WAF1	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1, synonyme CDK-1
P38MAPK	P38 Mitogen-Activated Protein Kinases
P70S6K	p70S6 kinase
P85	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, sous unité régulatrice
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PFS	Progression Free Survival
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, sous-unité catalytique alpha
PIK3CB	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, sous-unité catalytique beta
PIK3CC	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, sous-unité catalytique gamma

PIK3CD	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, sous-unité catalytique delta
PIK3R	Synonyme P85
PKC	Protéine Kinase C
PLC	Phospholipase C
PLCG	Phospholipase Cγ
PTB	Polypyrimidine tract-binding protein
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
PTN/MDK	Pleiotrophin / Midkine
PTPN11	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11
R	Récepteur
RAB	Protéines G membres de la famille RAS
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAN	RAs-related Nuclear protein
RAS	de Rat Sarcoma Virus
RASA1	RAS p21 protein activator
RASGAP	Synonyme RASA1
RCP	Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
RET	RET proto-oncogene
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RHEB	Ras Homolog Enriched in Brain
RHO	Famille de GTPases
ROR	Receptor tyrosine kinase-like Orphan Receptor
RR	Response Rate (Taux de réponse)
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
S6	Protéine ribosomale S6
SGLT1	Sodium-Glucose Transporters
SH	Santé Humaine
SH2	Src Homology 2
SH3BGRL	SH3 domain binding glutamate-rich protein like
SHC	Src homology 2 domain containing
SH-FORM	Santé Humaine - Formulaire (Formulaire édité par le COFRAC)
SH-GTA	Santé Humaine - Guide Technique d'Accréditation (Guide édité par le COFRAC)
SHP1	Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1
SH-REF	Santé Humaine - Référentiel (Référentiel édité par le COFRAC)

SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
SOS1	Son of sevenless homolog 1
SRC	Tyrosine-protein kinase CSK
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STAT1	STAT de type 1
STAT5	STAT de type 5
STIC	Soutien Techniques Innovantes Coûteuses
SYK	Spleen tyrosine kinase
Taq	*Thermophilus aquaticus*
TCS2	Tuberous Sclerosis Complex 2
TDM-1	Trastuzumab-Emtansine
TGFα	Transforming growth factor alpha
TIE	Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains
TIE2	Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains 2
TK	Tyrosine Kinase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF A	VEGF de type A
VEGF B	VEGF de type B
w/t	Wild-type (sauvage)
WNT	Wingless-type MMTV integration site family
Wnt5a	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A

Introduction générale

Le cancer colorectal est l'un des cancers les plus diagnostiqués avec plus d'un million de nouveaux cas chaque année dans le monde (1) dont 40 000 nouveaux cas et 9 200 décès en France (2). Dans les cancers colorectaux, plus particulièrement dans leur forme métastatique, l'évolution des traitements a permis d'améliorer de façon considérable la survie globale passant de 6 à 30 mois en 30 ans, notamment grâce à l'avènement de la chimiothérapie, puis des thérapies ciblées. Depuis les travaux de Hanahan et Weinberg qui décrivent la maladie cancéreuse selon 6 processus (3), puis dix ans plus tard selon 10 processus (4), le cancer apparait clairement comme une maladie de la signalisation cellulaire – ***Figure 1***.

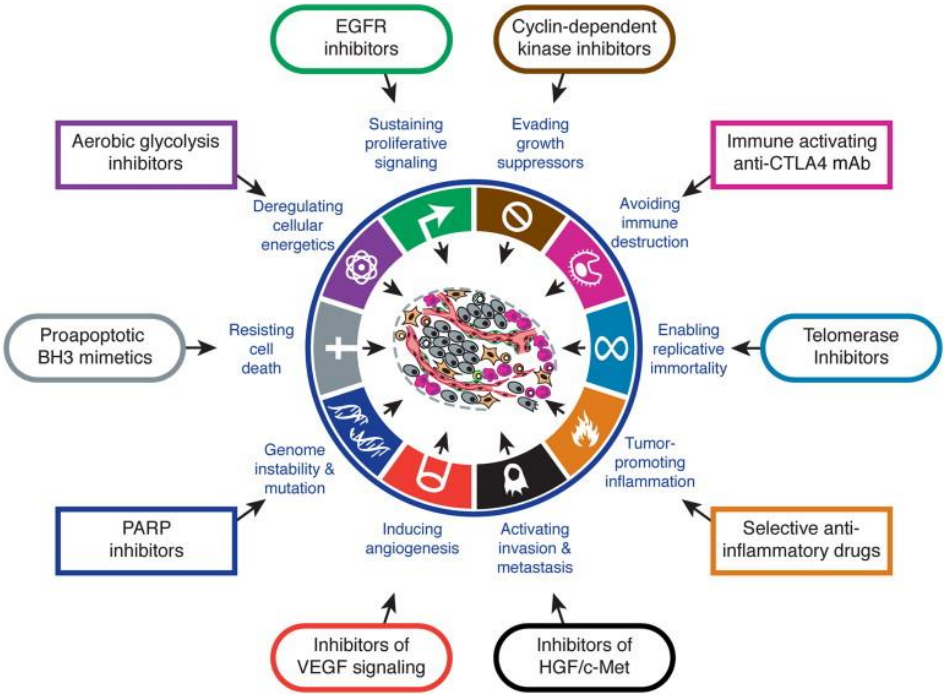


Figure 1 Les 10 processus de la maladie cancéreuse selon Hanahan et Weinberg. Il existe des médicaments visant spécifiquement à contrer chacune des capacités acquises par la cellule tumorale. Ces médicaments sont soit déjà disponibles sur le marché, soit en cours d'essais de phase III ou en cours d'essais plus précoces (4).

La meilleure connaissance des mécanismes cellulaires et plus particulièrement des voies de signalisation a permis d'améliorer la prise en charge des patients, notamment en proposant pour

chacune des anomalies acquises par la cellule cancéreuse, une thérapeutique ciblée. Certaines de ces thérapeutiques sont déjà utilisées en routine dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques, c'est le cas par exemple des médicaments ciblant les récepteurs au facteur de croissance épidermique (EGFR). D'autres molécules ciblant les autres anomalies sont quant à elles en cours de développement précoce ou en cours d'essai dans des études cliniques de Phases I, II ou III.

L'exemple le plus connu dans le domaine du traitement des cancers colorectaux métastatiques est celui de la protéine RAS. Bien que le gène *RAS*, codant pour cette protéine, soit connu comme étant un oncogène depuis le début des années 1980 (5, 6) ce n'est qu'en 2008 que le lien entre présence d'une mutation somatique sur les codons 12 ou 13 et résistance aux traitements anti-EGFR (cetuximab ou panitumumab) a été établi (7). Ces découvertes ont permis le développement du diagnostic moléculaire et de poser les premiers fondements de la théranostique en cancérologie digestive.

L'étude des biomarqueurs dans les cancers colorectaux est ainsi devenue la règle lors d'un diagnostic de cancer colorectal métastatique. Avant toute prescription d'un traitement anti-EGFR associé à une chimiothérapie, la recherche des mutations de *RAS*, plus précisément des exons 2, 3 et 4 de *KRAS* et de *NRAS*, est désormais obligatoire (8, 9). En plus de ces biomarqueurs maintenant bien connus, il semble indispensable d'étudier l'importance d'autres gènes comme *BRAF* et *PIK3CA*, fréquemment mutés dans les cancers colorectaux métastatiques (10).

Au delà des gènes, il est également fondamental de comprendre au niveau fonctionnel, les anomalies présentes au sein de la cellule cancéreuse. En effet, parmi les patients pouvant bénéficier d'un traitement par anti-EGFR, environ 50% ne répondent pas au traitement (11). Cela signifie nécessairement que d'autres facteurs influencent la réponse aux anti-EGFR et à la chimiothérapie et de nombreuses études sont actuellement consacrées à l'analyse fonctionnelle des tumeurs en vue d'identifier des biomarqueurs utiles à un meilleur guidage thérapeutique.

Chapitre I

Introduction bibliographique et objectifs du travail

I. Introduction bibliographique et objectifs du travail

I.1. Le cancer colorectal métastatique

I.1.1. Généralités sur le cancer colorectal métastatique

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, un cancer se caractérise par la prolifération rapide de cellules anormales qui peuvent essaimer dans d'autres organes, formant ce qu'on appelle des métastases. Le cancer colorectal est un cancer qui se développe dans le gros intestin. Le cancer du côlon se réfère, comme son nom l'indique, à un cancer qui se développe dans la plus longue partie du gros intestin : le côlon ; le cancer du rectum, dans la dernière partie du gros intestin se terminant par l'anus : Le rectum – ***Figure 2***.

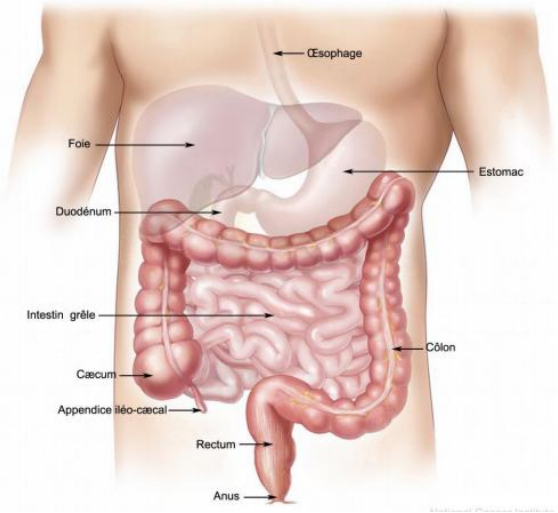


Figure 2 Anatomie du système digestif. Les parties du système gastro-intestinal sont, dans l'ordre, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le gros intestin (composé du côlon et du rectum) et l'anus. *D'après « Cancer colorectal : Un guide pour les patients » - ESMO 2013*.

Les cancers colorectaux sont classés en différents stades en fonction de l'étendue de la maladie, à l'aide de la classification TNM. Le paramètre T représente la combinaison des facteurs de taille de la

tumeur et d'envahissement des tissus voisins, le paramètre N correspond à l'atteinte des ganglions lymphatiques et le paramètre M renseigne sur le statut métastatique de la maladie - ***Tableau 1***.

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

Tableau 1 7ème classification TNM pour les cancers colorectaux, d'après Sobin *et al.* (12) et du Guide Affection Longue Durée de l'HAS et l'INCa « Tumeur maligne, Affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique – Cancer colorectal, Adénocarcinome », Janvier 2012.

A partir de la classification TNM, les cancers colorectaux sont ensuite classés en stades pronostics, les Stades I à III correspondant à une maladie localisée d'assez bon pronostic et le stade IV à une maladie avancée de moins bon pronostic - ***Tableau 2***.

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

Tableau 2 Classification en stades des cancers colorectaux. Plus le stade est élevé, plus la maladie est avancée et moins le diagnostic clinique est favorable. d'après Sobin *et al.* (12) et du Guide Affection Longue Durée de l'HAS et l'INCa « Tumeur maligne, Affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique – Cancer colorectal, Adénocarcinome », Janvier 2012.

I.1.2. Evolution des traitements du cancer colorectal métastatique

Depuis plus de 40 ans, un antimétabolite analogue des pyrimidines, le 5 Fluorouracile (5-FU), est le médicament principal utilisé dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques (13). L'ajout au 5-FU d'acide folinique, puis d'oxaliplatine et d'irinotécan a permis d'améliorer de manière considérable le taux de réponse (RR), la survie sans progression (PFS) et la survie globale (OS) chez les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique. Il existe clairement un lien entre l'OS et le nombre d'agents cytotoxiques utilisés (14). Des changements dans le mode d'administration du 5-FU, notamment son administration en perfusion continue (15) ou sa formulation sous forme de prodrogue orale, la capécitabine (16, 17) ont permis d'obtenir des bénéfices sur le RR, la PFS et l'OS. En 2000, l'utilisation d'un sel de platine, l'oxaliplatine a démontré son intérêt en association au 5-FU et à l'acide folinique (protocole LV5-FU2) permettant d'améliorer significativement la survie sans progression de 6,2 à 9,0 mois (p=0,0003) ainsi que le taux de réponse (50,7% *vs* 22,3% ; p=0,0001) (18), sans toutefois démontrer d'amélioration de la survie globale (16,2 *vs* 14,7 mois ; p=0,12). Toutefois, le protocole LV5-FU2 s'est révélé dans cette étude plus efficace en association à

l'oxaliplatine en termes de survie sans progression, au prix d'effets indésirables supportables et pour une qualité de vie identique ce qui en a fait un traitement de première ligne supérieur au LV5-FU2 seul. L'ajout au 5-FU d'un inhibiteur de la topoisomérase I, l'irinotécan, a également permis d'augmenter de façon considérable le taux de réponse globale (ORR) de 31 à 49% (p>0,001) ainsi que l'OS avec une médiane de survie évaluée à 17,4 mois dans le bras irinotécan contre 14,1 mois dans le bras 5-FU/LV (p=0,031) (19).

I.1.2.1. Les chimiothérapies cytotoxiques traditionnelles

Une association de plusieurs agents cytotoxiques doit être envisagée dès la première ligne de traitement chez les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique afin d'obtenir un contrôle de la maladie, une stabilisation, voire une régression. Chez les patients pour lesquels les foyers métastatiques sont plus limités et dans des organes accessibles facilement en chirurgie (foie, poumon), le but de l'utilisation de la chimiothérapie est également d'obtenir une résécabilité des foyers tumoraux et éventuellement permettre une guérison.

Il est admis que le traitement de première ligne d'un cancer colorectal doit être assez agressif pour la tumeur et comporter au minimum deux agents cytotoxiques. L'oxaliplatine ou l'irinotécan sont associés au 5-FU dans le protocole FOLFOX et FOLFIRI respectivement. Ces deux molécules sont considérées aujourd'hui comme équivalentes et interchangeables (20-22). Le 5-FU injectable est parfois remplacé par la capécitabine et associé à l'oxaliplatine (CAPOX ou XELOX) ou au FOLFIRI (CAPIRI).

Ainsi, l'association 5-FU (ou de sa prodrogue) avec l'oxaliplatine, ou l'association 5-FU avec l'irinotécan constituent les traitements principaux utilisés en traitement de première ligne des cancers colorectaux métastatiques. Le choix de l'utilisation de l'oxaliplatine ou de l'irinotécan est guidé par l'état physiopathologique du patient au regard des toxicités pouvant être rencontrées.

L'utilisation de trois agents de chimiothérapie a également été envisagée, notamment dans le protocole FOLFOXIRI et FOLFIRINOX (5-FU, Oxaliplatine et Irinotécan). Les taux de réponse complets (8% *vs* 6%) et partiels (58% *vs* 35%), le taux de résection complète (15% *vs* 6%, p=0,033), la PFS (9,8 *vs* 6,9 mois, p=0,0006) et l'OS (22,6 *vs* 16,7 mois, p=0,032) ont été significativement améliorés dans une étude de phase III de 2007 dans le bras FOLFOXIRI par rapport au bras FOLFIRI (23). Cependant, une autre étude tend à prouver le contraire, avec aucun bénéfice significatif de l'utilisation du protocole FOLFOXIRI par rapport au protocole FOLFIRI (24). Le protocole FOLFIRINOX a démontré son intérêt dans l'augmentation du taux de réponse avant chirurgie et de l'amélioration de la résécabilité chez les patients présentant des localisations hépatiques de leur maladie (25).

Les études utilisant une trithérapie 5-Fluorouracile, oxaliplatine et irinotécan se rejoignent cependant sur des toxicités accrues, ce qui en clinique, permet difficilement l'utilisation des protocoles FOLFOXIRI ou FOLFIRINOX en pratique courante.

I.1.2.2. Anticorps monoclonaux, protéines de fusion recombinantes et inhibiteurs de kinases utilisés dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques

L'ajout d'une thérapie ciblée à ces chimiothérapies a globalement été démontré comme bénéfique. Ces biothérapies ciblent spécifiquement les récepteurs aux facteurs de croissance épidermiques (EGFR) (Panitumumab, Cetuximab) ou les facteurs vasculaires endothéliaux (VEGF) (Bevacizumab, Aflibercept).

Les molécules anti-EGFR utilisées en association avec la chimiothérapie dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques sont des anticorps monoclonaux spécifiquement dirigés contre le récepteur à l'EGF (EGFR). Le Panitumumab est un anticorps monoclonal recombinant humain de type IgG_2 et le Cetuximab un anticorps monoclonal recombinant chimérique de type IgG_1. Depuis 2008, il est reconnu que la présence d'une mutation des codons 12 ou 13 du gène *KRAS* sur

l'ADN tumoral est un facteur prédictif de résistance aux traitements anti-EGFR (7). La présence de mutation sur les codons 12 et 13, c'est à dire l'exon 2 de *KRAS* représente environ 40% des cas. Parmi les patients dits « wild-type », c'est à dire dont les tumeurs ne portent pas de mutation sur l'exon 2, environ 40 à 50% ne répondent cependant pas ou mal aux anti-EGFR (26). Ces résultats démontrent qu'il existe d'autres facteurs potentiellement impliqués dans la réponse aux anti-EGFR. Ainsi, en 2013, il a été démontré qu'en plus des mutations des codons 12 et 13, la présence de mutation sur les exons 2, 3 et 4 de *KRAS* ou de *NRAS*, un autre isoforme de la protéine RAS, était un facteur prédictif d'absence de réponse aux anti-EGFR (8, 27).

L'influence de la présence de mutations sur les gènes codant pour des protéines intervenant dans la voie de signalisation des MAP Kinases ou de la voie PI3K/AKT/mTOR, a été recherchée. Ainsi, l'influence des mutations des gènes *BRAF*, *PIK3CA* ou encore de l'expression de la protéine PTEN sont des facteurs déjà très étudiés (28). Globalement, la présence de mutation sur *BRAF*, *PIK3CA*, tout comme sur *KRAS* ou *NRAS*, ainsi que la perte d'expression de PTEN sont des facteurs diminuant la survie globale, mais seule la présence de mutation sur les exons 2, 3 et 4 de *KRAS* ou de *NRAS* est un marqueur prédictif reconnu de réponse aux anti-EGFR.

I.1.2.2.1. Le panitumumab

Le Panitumumab, commercialisé sous le nom Vectibix® par le laboratoire AMGEN, est le premier anticorps monoclonal anti-EGFR ayant obtenu grâce aux résultats de l'étude PRIME, l'autorisation de mise sur le marché, dans le traitement de première ligne des cancers colorectaux métastatiques en association à une chimiothérapie de type FOLFOX chez les patients dont le statut mutationnel des codons 12 et 13 de *KRAS* est sauvage (26). C'est seulement en 2013 que son indication a été restreinte aux patients dont les tumeurs sont dites « super wild-type », c'est à dire ne portant pas de mutation sur les exons 2, 3 et 4 de *KRAS* et *NRAS* (8, 29). L'ajout du panitumumab

au protocole de type FOLFOX 4 augmente de façon significative la PFS (10,0 mois *vs* 8,6 mois, HR=0,80, p=0,01) mais la significativité n'est pas atteinte pour l'OS (23,9 mois *vs* 19,7 mois, HR=0,88, p=0,17). Une analyse exploratoire (mise à jour sur plus de 80% des évènements de l'OS) permet cependant de montrer de façon significative une amélioration (HR=0,83 ; p=0,03). Dans l'étude PRIME, 9% des patients (53 patients) portaient une mutation du gène *BRAF* sur l'ADN extrait de leur tumeur. Pas de différence statistiquement significative n'a été retrouvée compte tenu du faible effectif pour un bras de traitement plutôt qu'un autre. Cependant, la présence d'une mutation *BRAF* s'est révélé être un facteur de mauvais pronostic.

Dans l'étude PEAK (30), étude de Phase II randomisée avec un bras mFOLFOX6 + panitumumab et un bras associant le protocole mFOLFOX6 à un antiangiogénique, le bevacizumab, l'objectif principal était la comparaison de la PFS. Lorsque l'on compare les patients présentant une mutation sur l'exon 2 de *KRAS* aux autres patients, cette étude ne démontre pas de façon significative un bénéfice sur la PFS entre les deux bras (PFS médiane de 10,9 *vs* 10,1, HR=0,87, p=0,353), cependant, un bénéfice sur l'OS a été retrouvée chez les patients du bras panitumumab (OS médiane de 34,2 mois *vs* 24,3 mois, HR=0,62, p=0,009). Suite aux nouvelles publications concernant l'impact sur la réponse aux traitements par anti-EGFR des mutations des exons 2, 3 et 4 de *KRAS* et *NRAS*, une nouvelle analyse a été effectuée et permet cette fois de mettre en évidence de manière significative un bénéfice de l'utilisation du panitumumab sur la PFS (PFS médiane de 13 mois *vs* 10,1 mois, HR=0,65, p=0,029) ainsi que sur la survie globale (OS médiane 41,3 mois *vs* 28,9 mois, HR=0,63, p=0,058). Il a été également démontré que l'utilisation du panitumumab sur les patients présentant une mutation sur les exons 3 ou 4 de *KRAS* ou 2, 3 et 4 de *NRAS* était délétère sur la PFS (7,8 mois *vs* 8,9 mois, HR=1,39).

I.1.2.2.2. Le cetuximab

Le cetuximab est un anticorps monoclonal chimérique anti-EGFR de type IgG_1 commercialisé sous le nom Erbitux® par les laboratoires Merck-Serono. Il a d'abord été utilisé sans distinction chez tous les patients atteints de cancers colorectaux, puis, comme le panitumumab, son indication a été restreinte d'abord aux patients wild-type pour les codons 12 et 13 de *KRAS*, puis fin 2013 aux patients « super wild-type », sans mutation sur les exons 2, 3 et 4 de *KRAS* et *NRAS*.

Dans l'une des premières études, l'étude de phase III CO.17 chez des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique et en dernière ligne de chimiothérapie, le cetuximab était comparé à des soins de support (Best supportive care). Le cetuximab utilisé en monothérapie a alors montré un bénéfice significatif sur la survie globale (6,1 *vs* 4,6 mois ; HR=0,77 ; p=0,005) et sur la survie sans progression (HR=0,68 ; p < 0,0001) (31). L'AMM du cetuximab associé à un protocole de chimiothérapie en première ligne de traitement chez les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique a été obtenue initialement suite à deux études majeures. L'étude de Phase III CRYSTAL étudiait l'intérêt de l'association du cetuximab au protocole de type FOLFIRI chez les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique. Cette étude a démontré que l'ajout du cetuximab chez les patients était significativement bénéfique sur la survie sans progression (8,9 *vs* 8,0 mois ; p=0,048) mais pas sur la survie globale (19,9 *vs* 18,6 mois ; p=0,31) (32). Suite à la publication des résultats indiquant l'importance des mutations des codons 12 et 13 de *KRAS* (7) dans la réponse aux anti-EGFR, une nouvelle analyse a été effectuée uniquement chez les patients wild-type. Cette nouvelle analyse a permis de mettre en évidence un bénéfice significatif sur la survie sans progression (9,9 *vs* 8,4 mois) et cette fois également sur la survie globale (23,5 mois *vs* 20,0 mois) (33). L'étude de phase II OPUS quant à elle étudiait l'intérêt de l'ajout du cetuximab à une chimiothérapie de type FOLFOX. L'ajout du cetuximab n'apportait pas significativement de bénéfice dans l'analyse initiale, mais en considérant les patients wild-type pour les codons 12 et 13 de *KRAS*, la survie sans progression était significativement améliorée dans le groupe cetuximab (HR=0,567 ; p = 0,0064) (34). L'importance du

statut *KRAS* a été soulignée dans une mise à jour de l'analyse statistique en 2011, affirmant l'utilité de ce paramètre comme biomarqueur prédictif de réponse au traitement par anti-EGFR (35).

Une analyse poolée des résultats des études CRYSTAL et OPUS a permis à travers l'étude de 845 patients de confirmer le bénéfice apporté par le cetuximab à une chimiothérapie de type FOLFOX ou FOLFIRI, avec des résultats significatifs aussi bien sur la survie sans progression (HR=0,66 ; $p < 0,001$) et sur la survie globale (HR=0,81 ; p=0,0062) (36).

Les récentes publication sur l'importance des mutations sur les exons 2, 3 et 4 de *KRAS* et *NRAS* sur la réponse aux anti-EGFR a permis d'améliorer la sélection des patients pouvant bénéficier de ce type de traitement. Ainsi, la sélection des patients « super wild-type » permet une augmentation significative de la survie sans progression (HR=0,62 ; $p < 0,001$) et sur la survie globale (HR=0,87 ; p=0,008) (27).

I.1.2.2.3. Le bevacizumab

Le bevacizumab, commercialisé sous le nom Avastin® par le laboratoire Roche est un anticorps monoclonal de type IgG_1 spécifiquement dirigé contre le facteur de croissance vasculaire de type A (VEGF A). La capture du VEGF par le bévacizumab va empêcher l'activation des récepteurs au VEGF (VEGFR-1 et VEGFR-2), ce qui confère à cette molécule une activité antiangiogénique. Le bevacizumab est utilisé en association à la chimiothérapie dans le traitement de première ligne des cancers colorectaux métastatiques, mais également dans les cancers du sein, les cancers rénaux, les cancers de l'ovaire et les cancers bronchiques.

Dans l'étude E3200, l'ajout du bevacizumab à un protocole de type FOLFOX en seconde ligne de traitement chez les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique a démontré un bénéfice significatif sur la survie sans progression (7,3 *vs* 4,7 mois ; $p < 0,001$) et sur la survie globale (12,9 *vs*

10,8 mois ; p = 0,0011) (37). Dans l'étude ML18147, il a été montré que le maintien du bevacizumab en seconde ligne après une première ligne de chimiothérapie en comportant déjà, avait un impact significatif sur la survie sans progression (5,7 *vs* 4,1 mois ; p<0,001) et sur la survie globale (11,2 *vs* 9,8 mois ; p = 0,0062) (38) et cela indépendamment du statut mutationnel du gène *KRAS* (39). Une méta analyse de 29 études a montré que la survie sans progression et la survie globale médianes étaient respectivement de 10,8 et 23,7 mois avec l'association Bévazcizumab FOLFIRI en première ligne de traitement (40).

Enfin, l'utilisation du protocole FOLFIRINOX en association au bevacizumab s'est révélée prometteuse chez des patients réfractaires aux autres thérapeutiques, avec notamment une survie globale de 11,9 mois (IC 95% [8-18]) (41).

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

I.1.2.2.4. L'aflibercept

L'aflibercept commercialisé sous le nom Zaltrap® par les laboratoires Sanofi est une protéine de fusion issue du génie moléculaire capable d'emprisonner le VEGF de type A et B. Cette molécule possède l'AMM en seconde ligne de traitement du cancer colorectal métastatique. Dans l'étude VELOUR, l'ajout de l'aflibercept à un protocole de type FOLFIRI en seconde ligne, après une première ligne contenant de l'oxaliplatine, permet d'augmenter de manière significative la survie sans progression (6,90 *vs* 4,67 mois ; p < 0,001) et la survie globale (13,50 *vs* 12,06 mois ; p = 0,0032) (42). Comme pour le bevacizumab, il n'existe pas à ce jour de biomarqueur prédictif validé de réponse au traitement.

I.1.2.2.5. Le regorafenib

Le régorafenib est un inhibiteur de tyrosine kinase multicible (VEGFR 1, 2 et 3, TIE2, RET, RAF-1, BRAF, PDGFR et FGFR). Il est commercialisé sous le nom de Stivarga® par le laboratoire Bayer Pharma. Il est aujourd'hui indiqué en troisième ligne de traitement dans les cancers colorectaux métastatiques suite aux résultats de l'étude CORRECT qui comparait son utilisation à des soins de support chez des patients en dernière ligne de traitement. La survie globale s'est révélée significativement meilleure chez les patients traités par regorafenib (6,4 *vs* 5,0 mois ; p=0,0052) (43). Il n'existe pas à ce jour de biomarqueur prédictif validé de réponse au traitement.

I.1.3. Intérêt de l'évolution des traitements sur la **survie globale chez les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique**

En 30 ans, l'évolution des traitements du cancer colorectal métastatique a permis d'augmenter la survie globale de manière considérable. En effet, d'une maladie au pronostic très sombre avec une espérance de survie courte de l'ordre de 6 mois, les dernières études font désormais état d'une survie globale dépassant les 30 mois (44) – ***Figure 3***

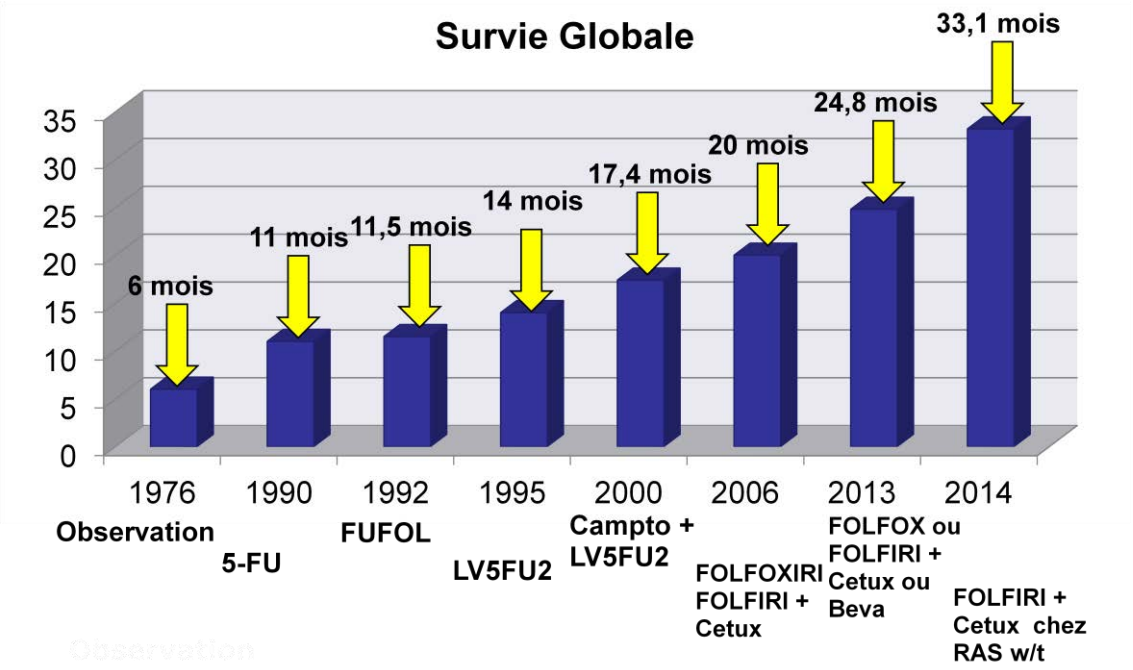


Figure 3 Evolution de la survie globale de 1976 à nos jours. L'utilisation d'une mono chimiothérapie, puis de l'association de plusieurs cytotoxiques et enfin de thérapies ciblées ont permis de multiplier quasiment par 6 la survie globale médiane des patients atteints de cancers colorectaux métastatiques

L'avènement des thérapies ciblées est pour beaucoup dans l'augmentation de cette survie globale et la meilleure prise en charge de cette maladie. Il est aujourd'hui encore difficile de savoir s'il vaut mieux privilégier un anti-EGFR ou un antiangiogénique en première ligne de traitement.

Dans l'étude FIRE-3 qui comparait l'utilisation d'un protocole FOLFIRI avec le cetuximab ou le bevacizumab, la survie globale est significativement meilleure chez les patients RAS wild-type ayant reçu l'anti-EGFR (28,7 vs 25,0 mois ; p=0,017) (44).

Les résultats de l'étude CALGB sont pour le moment partiels, puisque cette étude visant à étudier l'ajout du cetuximab ou du bevacizumab en première ligne de traitement par FOLFOX ou FOLFIRI, n'a pour le moment considéré que les patients sauvages pour les codons 12 et 13 de KRAS et pas les super wild-type. Aucune différence significative de survie globale n'a ainsi été démontrée entre les deux bras de traitement (45).

I.2. Signalisation cellulaire dans les cancers colorectaux

Le développement des connaissances sur les mécanismes favorisant les processus de tumorisation fait apparaître que le cancer est une maladie de la signalisation cellulaire (4), dépendante d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs. Les recherches de ces dernières années ont permis d'élucider une partie des mécanismes moléculaires ainsi que les différentes voies de signalisation impliquées dans la cancérisation des tissus. Une superfamille de récepteurs joue un rôle très important dans la transformation tumorale d'une cellule : les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) (46). Dix-huit familles de RTK sont identifiées chez les vertébrés – ***Figure 4***.

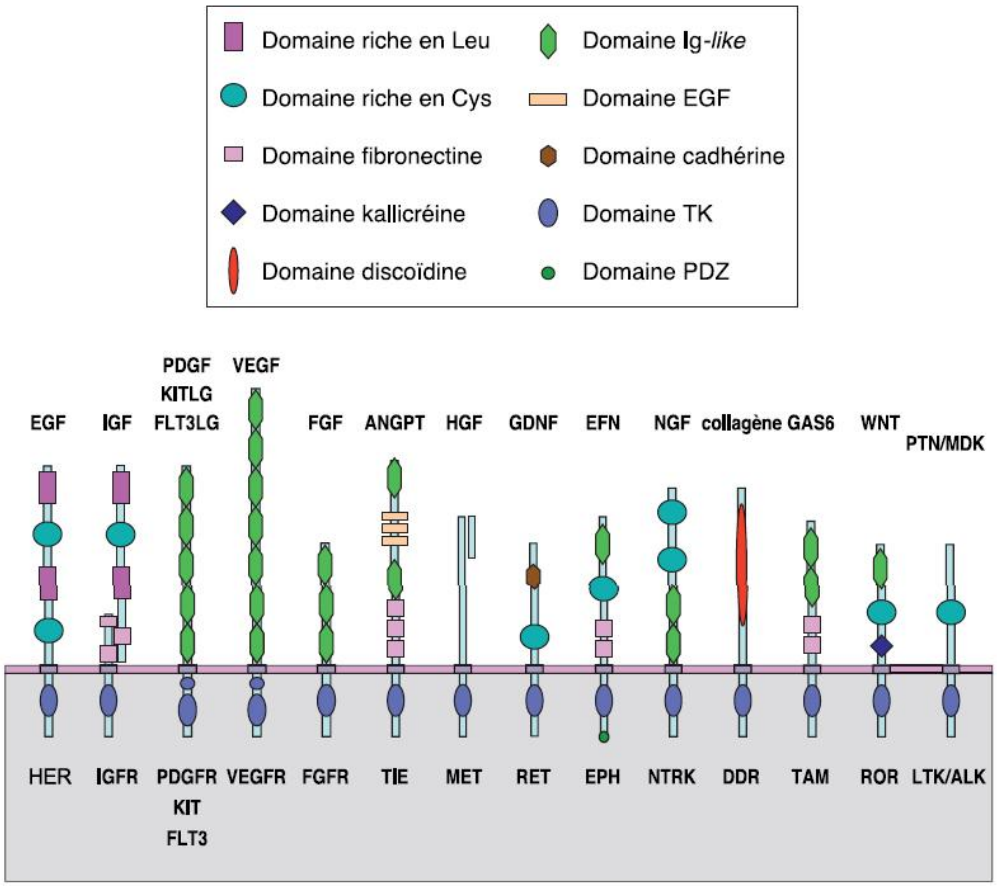


Figure 4 Récepteurs à activité tyrosine kinase. Les récepteurs à l'EGF et au VEGF font partie de cette super famille de récepteurs. D'après J. Robert (47)

Ces récepteurs sont présents et exprimés dans de nombreux tissus et possèdent un rôle dans la physiologie normale des cellules. En particulier, les récepteurs de la famille HER (Human Epidermal Receptors) jouent un rôle déterminant dans les mécanismes de cancérisation des cellules. Quatre récepteurs homologues forment cette famille. Les récepteurs HER-1 (ou EGFR ou encore C-erbB), HER-2 (ou C-erbB2 ou neu), HER-3 (ou C-erbB3) et HER-4 (ou C-erbB4) – ***Figure 5***.

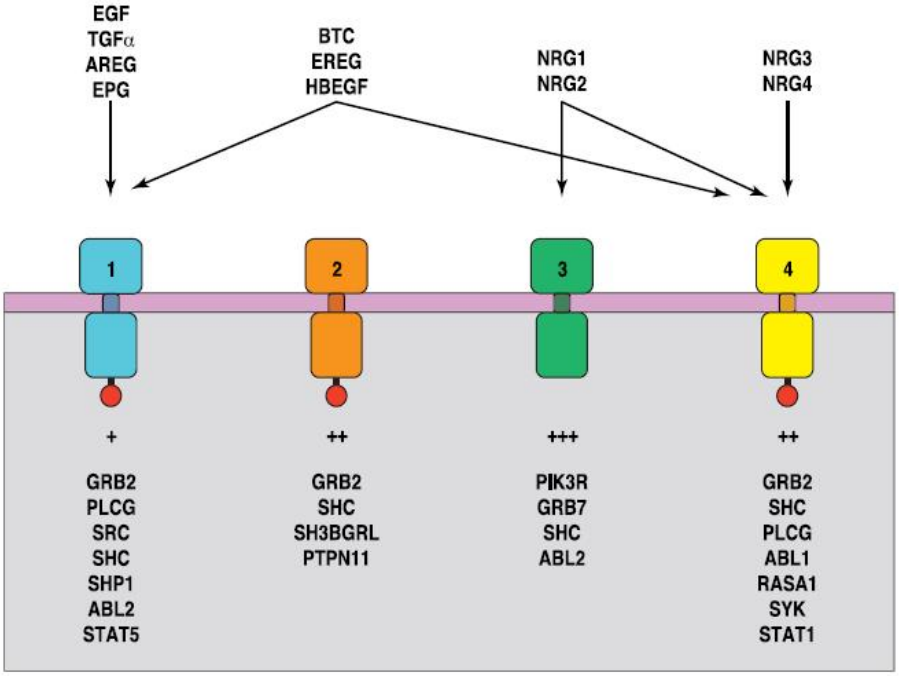


Figure 5 Les récepteurs HER et leurs ligands. La fixation du ligand va provoquer l'activation du récepteur ce qui permettra alors sa dimérisation et l'activation des voies de signalisation. D'après J. Robert (47)

I.2.1. Les récepteurs HER

La structure des récepteurs HER est identique à celle de tous les RTK : Ils sont formés d'une seule chaine polypeptidique qui forme un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracytoplasmique. Le domaine extracellulaire possède un site de fixation du ligand du récepteur ainsi que deux domaines riches en Cystéine. Le domaine transmembranaire est en hélice alpha. Enfin, le domaine intracytoplasmique possède une activité tyrosine kinase.

Les rôles des récepteurs HER sont multiples. En particulier, ils sont essentiels à la promotion de la division et à la survie cellulaire. Ils stimulent la progression cellulaire et inhibent l'apoptose. Les récepteurs HER ont également un rôle dans les mécanismes d'invasion cellulaire et d'angiogenèse.

Un bon nombre de ligands des récepteurs HER ont été identifiés. En particulier, EGF, TGFα, des amphirégulines, des épirégulines et des facteurs de croissance pour HER-1 et des hérégulines pour HER-3 et HER-4. Aucun ligand pour HER-2 n'a été identifié à ce jour. Son extrémité N-terminale est de manière constitutive dans une conformation proche de celle observée lors de l'activation des autres récepteurs de la même famille. Ce récepteur est par conséquent capable de se dimériser en permanence. Son mode de régulation pourrait être dépendant de sa partie transmembranaire (48).

I.2.1.1. HER 1 ou EGFR

HER 1 ou EGFR est le premier récepteur à activité tyrosine kinase qui a été caractérisé (49, 50) ainsi que l'un des premiers proto-oncogènes identifié (51). C'est une glycoprotéine transmembranaire de 170 kDa (52). HER1 comporte 3 domaines distincts : un domaine extracellulaire de 621 acides aminés (53), un domaine transmembranaire de 23 acides aminés (54) et un domaine intracellulaire de plus de 540 acides aminés (54). EGFR intervient dans le développement des tissus d'origine épithéliale. Il est intéressant de noter que les trois autres membres de la famille HER (HER 2, 3 et 4) ont pour leur part un rôle prépondérant dans le développement des tissus nerveux et musculaires squelettiques (50). L'activation d'EGFR est responsable d'une augmentation de la prolifération et de la motilité cellulaire ainsi que d'une diminution de l'apoptose. D'un point de vue clinique, la surexpression d'EGFR est retrouvée dans de nombreux cancers aussi bien du tractus digestif ou du tractus respiratoire et ORL, que de la sphère génitale ou du système nerveux (55-59). Dans tous les cas, la surexpression d'EGFR est associée à un pronostic péjoratif et à une agressivité accrue de la maladie, notamment avec une augmentation du potentiel métastatique (60, 61). EGFR possède un rôle dans le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse ainsi qu'un rôle dans la régulation des

métalloprotéases matricielles (62). EGFR possède également un rôle dans la régulation des phénomènes d'angiogenèse tumorale, notamment grâce à son rôle de régulation du VEGF-A (63). Enfin, un lien de plus en plus évident semble exister entre les récepteurs EGFR et les cellules souches tumorales (64). Enfin, EGFR permet de manière indépendante de son activité kinase, de favoriser la survie cellulaire par inhibition des phénomènes d'autophagie de par son rôle stabilisant des transporteurs du glucose SGLT1 (65).

L'affinité des récepteurs à l'EGF pour son ligand, l'EGF, est variable. Ainsi, on estime que 10% des récepteurs à l'EGF possèdent une affinité haute, tandis que 90% possèdent une affinité dite basse (66-70). En fonction du sous-type de récepteur à l'EGF (haute ou basse affinité), différentes voies de signalisation seront stimulées de façon préférentielle ; ainsi la fixation au sous-type de forte affinité aura pour conséquence une activation des voies RAS/RAF/MAPKinases et PI3K/AKT/mTOR, tandis qu'une fixation du ligand aux récepteurs à l'EGF de sous-type de basse affinité aura pour conséquence une activation de la voie des STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) et de la voie PLCγ/PKC (Phospholipase Cγ / Protéine Kinase C) (69).

La localisation d'EGFR n'est pas uniquement membranaire, il existe également une localisation nucléaire d'EGFR (71-73) avec des fonctions précises, notamment l'activation directe de la transcription des gènes impliqués dans l'inflammation comme les gènes codant pour la COX-2 (Cyclo-oxygénase de type 2) (74) ou encore dans le cycle cellulaire comme le gène codant pour la cycline D1 (75). L'expression nucléaire de EGFR est associée à une augmentation des risques de progression de la maladie, une diminution de la survie globale ainsi qu'une résistance à la radiothérapie (76) et à la chimiothérapie (77-81).

EGFR est une cible privilégiée dans le traitement des cancers pulmonaires, des voies aérodigestives supérieures et colorectaux. Des inhibiteurs de kinase comme le gefitinib ou l'erlotinib sont ainsi utilisés chez les patients atteints d'un cancer bronchique non à petites cellules présentant une mutation de sensibilité sur le gène *EGFR* (82, 83), et le cetuximab et le panitumumab sont deux

anticorps monoclonaux ciblant spécifiquement EGFR et utilisés dans le traitement du cancer colorectal métastatique (29, 35).

I.2.1.2. HER 2

HER 2, encore appelé ErbB2 (pour sa similarité avec l'oncogène viral v-ErbB du virus de l'érythroblastose aviaire), ou *neu*, est un récepteur à activité tyrosine kinase de 185 kDa (84) qui comporte un domaine extracellulaire d'environ 600 acides aminés, un domaine transmembranaire en hélice et un domaine intracellulaire portant la fonction tyrosine kinase d'environ 500 acides aminés (52). HER2 ne possède pas de ligand propre. Il présente en permanence une conformation dépliée permettant sa dimérisation avec les autres récepteurs sans activation préalable (85). Il semble cependant qu'un mécanisme dépendant de la partie transmembranaire du récepteur soit responsable de sa régulation (48).

HER-2 est surexprimé dans 10 à 30% des cancers du sein (86) et est la cible de nombreuses thérapies dans cette pathologie comme le trastuzumab, le pertuzumab, le TDM-1, le lapatinib ou encore d'autres molécules en cours de développement. HER-2 est également surexprimé dans les cancers de la sphère digestive (œsophage, estomac) et de la sphère génitale (ovaire, endomètre) (46). Des mutations de HER-2 sont retrouvées dans les cancers précédemment cités avec des fréquences inférieures à 2% (87), et on les rencontre également dans les cancers bronchiques non à petites cellules (88).

Dans les cancers colorectaux, la fréquence de mutation de HER2 est d'environ 5%, sa surexpression est retrouvée dans 11 à 43% des cas et son amplification dans 2 à 23% des cas (87). La surexpression de HER2 dans les cancers colorectaux est synonyme d'un diagnostic plus péjoratif, avec diminution de la survie globale et augmentation du risque d'évolution vers une maladie métastatique (89).

Malgré la surexpression de HER2 retrouvée dans les cancers colorectaux, peu d'études cliniques ont expérimenté l'utilisation de thérapies anti-HER2 malgré des résultats pré-cliniques encourageants

(90) et la publication d'une description de cas montrant une efficacité chez un patient résistant au cetuximab (91). Le site clinicaltrials.gov recense à ce jour seulement trois études de Phase II faisant appel au trastuzumab en association à une chimiothérapie pour le traitement des cancers colorectaux métastatiques. Ces études se sont probablement révélées négatives, puisque les études sont clôturées mais les résultats n'ont jamais été publiés.

I.2.1.3. HER 3

HER3 est une protéine transmembranaire de 160 KDa. HER3 est considéré comme un récepteur déficient car possédant un domaine intracellulaire tronqué ne portant pas d'activité kinase intrinsèque (92). HER3 possède 14 tyrosines, qui, une fois phosphorylées peuvent intervenir dans l'activation de voies de signalisation cellulaire. Il peut se dimériser avec tous les autres types de récepteurs HER (HER1, HER2, HER3 ou HER4), mais seuls les 3 hétérodimères potentiellement formés avec HER1, HER2 et HER4 sont fonctionnels (92). HER3 possède 6 sites phosphotyrosines permettant l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR par l'activation directe d'AKT. Les hétérodimères, le plus fréquemment avec HER2, sont donc de très forts activateurs de la voie PI3K/AKT/mTOR, voie associée à la survie cellulaire et à la résistance à certaines thérapeutiques anticancéreuses (93). L'activation de HER3 dans la maladie cancéreuse ne passe pas par une amplification génique comme pour HER1 ou HER2, mais par une activation paracrine de son ligand, la neuréguline 1 (93). La surexpression de HER3 est retrouvée dans de nombreux organes comme le poumon, l'estomac, le pancréas et les glandes mammaires. On retrouve sa surexpression notamment dans 20 à 30 % des cancers mammaires et cette surexpression est associée à un pronostic péjoratif, mais cela est en particulier dû à l'association fréquente avec la surexpression de HER2.

Dans les cancers colorectaux, peu de données sont disponibles sur l'expression de HER3. Les thérapeutiques ciblant HER3 font pour le moment l'objet d'études de Phase I. Seules les premiers résultats d'études de Phase II pourront déterminer de l'intérêt du ciblage thérapeutique d'HER3.

I.2.1.4. HER 4

HER4 présente des similarités avec EGFR, il peut d'ailleurs, en plus d'être activé par des neurégulines, être activé par des ligands communs avec ceux de l'EGFR (93). Contrairement aux autres récepteurs de la famille HER, HER4 possède plutôt une action antiprolifération et pro-apoptotique (94, 95). Quatre isoformes d'HER4 ont été décrits (JMa ou JMb et Cyt1 ou Cyt2) résultant d'un épissage alternatif de l'ARNm codant pour HER4 (96) ; l'isoforme Cyt2 est d'ailleurs incapable d'activer la voie PI3K/AKT/mTOR. La participation de HER4 dans la séquestration de HER3 a été décrite, faisant de son expression un facteur de bon pronostique dans les cancers du sein précoces (92). Les mutations activatrices de HER4 sont assez fréquentes dans les mélanomes et en font une potentielle cible thérapeutique (97).

Dans les cancers colorectaux, l'expression de HER4 est retrouvée de manière fréquente (environ 80%) des cas (98), mais peu de mutations du gène codant pour HER4 sont retrouvées (moins de 3%) (99). De plus, le polymorphisme -782G>T présent sur le promoteur de HER4 a été décrit comme un facteur de risque pour le développement de cancers colorectaux (100).

I.2.1.5. Mécanismes d'activation

Lorsque le récepteur reçoit son ligand sur sa partie extra-membranaire, un site permettant la liaison entre deux molécules de récepteurs se démasque. Ce démasquage de ce site de liaison va permettre à deux molécules de récepteur de se dimériser. A l'état inactif, le récepteur est à l'état replié et aucune interaction avec une autre molécule de récepteur n'est possible (47). La fixation au ligand permet le passage de la forme repliée à la forme dépliée et découvre le site permettant à la molécule de récepteur de se fixer à une autre molécule de récepteur liée à un ligand et elle aussi en configuration dépliée. Le récepteur HER2 ne possédant pas de ligand et étant en configuration

activée en permanence, peut se dimériser avec une molécule de récepteur activée à n'importe quel moment.

La dimérisation des récepteurs va provoquer leur activation. Cette dimérisation s'effectue soit entre récepteurs d'un groupe identique pour former un homodimère, soit entre récepteurs d'un groupe différent pour former un hétérodimère – ***Figure 6***. La dimérisation va permettre aux deux domaines catalytiques intra-membranaires des deux molécules de se rencontrer et de former ainsi la « poche à ATP ». Cette poche à ATP et un site actif permettant la fixation de l'ATP permettent ainsi une activité tyrosine kinase et la phosphorylation de 2 résidus tyrosine qui seront reconnues par des protéines porteuses de domaines SH2 et PTB. Les voies de signalisation peuvent alors être mises en œuvre par le biais de kinases, de phosphatases ou de protéines adaptatrices comme par exemple PIK3R1.

Une fois le récepteur activé, une cascade de réactions a lieu en aval de celui-ci selon les mêmes mécanismes. L'activation est définitive et seule l'internalisation du récepteur puis son recyclage par endocytose ou sa dégradation par voie lysosomale mettront fin à cette activation. Différentes voies de signalisation sont impliquées en aval des HER, en particulier la voie des MAPKinases, la voie PI3K/AKT/mTOR, ou encore la voie Wnt – ***Figure 7***

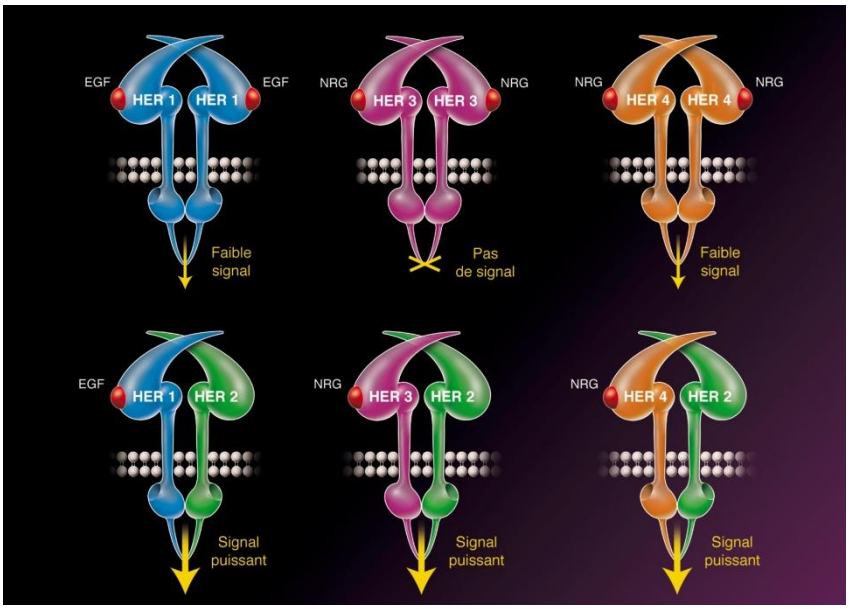


Figure 6 Homo et hétérodimères pouvant être formés avec les 4 types de récepteurs HER. Les hétérodimères se caractérisent par un signal puissant alors que les homodimères ne possèdent qu'un signal faible voire inexistant dans le cas des homodimères HER3 – *D'après une illustration GSK Oncology*

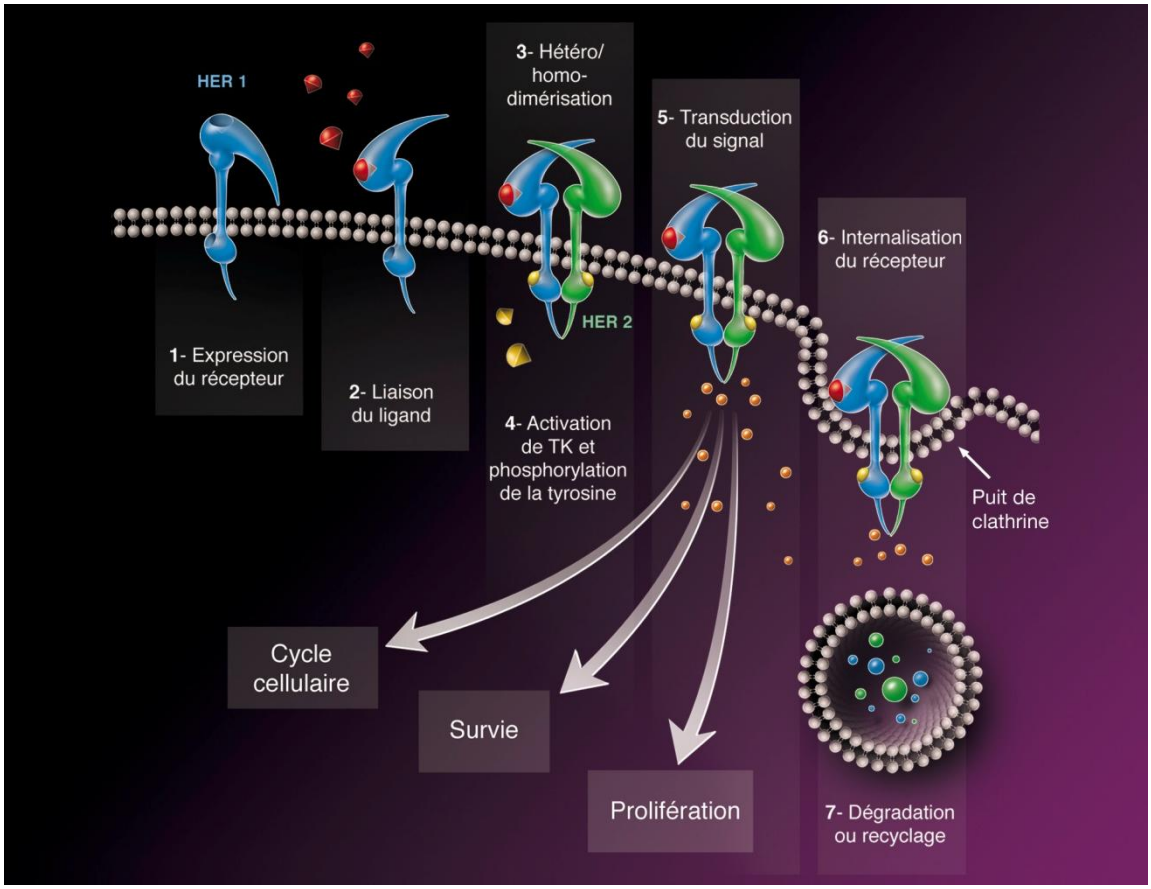


Figure 7 La fixation de son ligand par le récepteur va permettre sa dimérisation et l'activation d'activité kinase. Seule l'endocytose et la dégradation par le lysozyme permet l'inactivation du dimère - *D'après une illustration GSK Oncology*

I.2.2. Voie des MAPKinases

La voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) est une des principales voies de contrôle de la prolifération cellulaire. Cette voie intervient en aval de nombreux récepteurs, en particulier les récepteurs à l'EGF et est responsable de l'activation d'un grand nombre de facteurs de transcription : les MAP. Cette voie est impliquée dans le développement d'un grand nombre de tumeurs humaines, ce qui explique qu'elle est l'une des voies les plus ciblées au niveau pharmacologique. La voie des MAPK implique l'activation de la protéine RAS qui est à l'origine des activités de phosphorylation de RAF, MEK et ERK (47).

RAS désigne une famille de protéines à activité GTPasique. Cette famille est constituée de plus de 150 membres, divisés en cinq familles principales : RAS, RAB, ARF, RAN et RHO (101). RAS existe sous deux états : l'état inactif lié au GDP et l'état actif, lié au GTP. La forme RAS-GTP active la protéine RAS et PI3K (102). L'activation de RAS va provoquer la phosphorylation de la sérine-thréonine kinase RAF. L'effecteur direct de RAF est la protéine MEK.

Les mutations des RAS vont provoquer une altération de l'activité GTP-ase intrinsèque de la protéine et son accumulation sous forme RAS-GTP. RAS sera alors sous sa conformation active et cela indépendamment de l'état d'activation des récepteurs situés en amont – ***Figure 8***

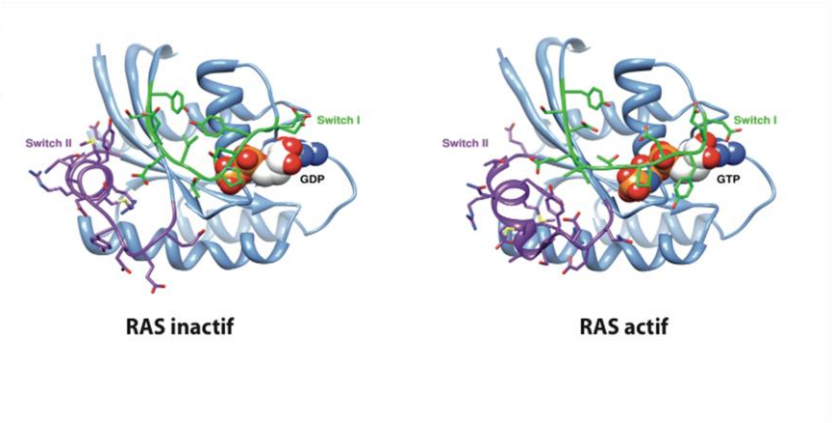


Figure 8 La phosphorylation du GDP en GTP fais passer la protéine RAS de sa forme inactive à sa forme active. D'après Pettersen *et al* (103)

MEK fait également partie de la famille des sérine-thréonine kinases. MEK est activée par RAS mais également par MEK Kinase. Son activation provoque la double phosphorylation de la protéine ERK.

ERK est activée par MEK, mais également par d'autres mécanismes indépendants utilisant des intégrines. ERK est capable de phosphoryler plus d'une centaine de substrats différents, ce qui explique sa forte implication dans la différenciation, la mobilité, la survie et la prolifération cellulaire – ***Figure 9***.

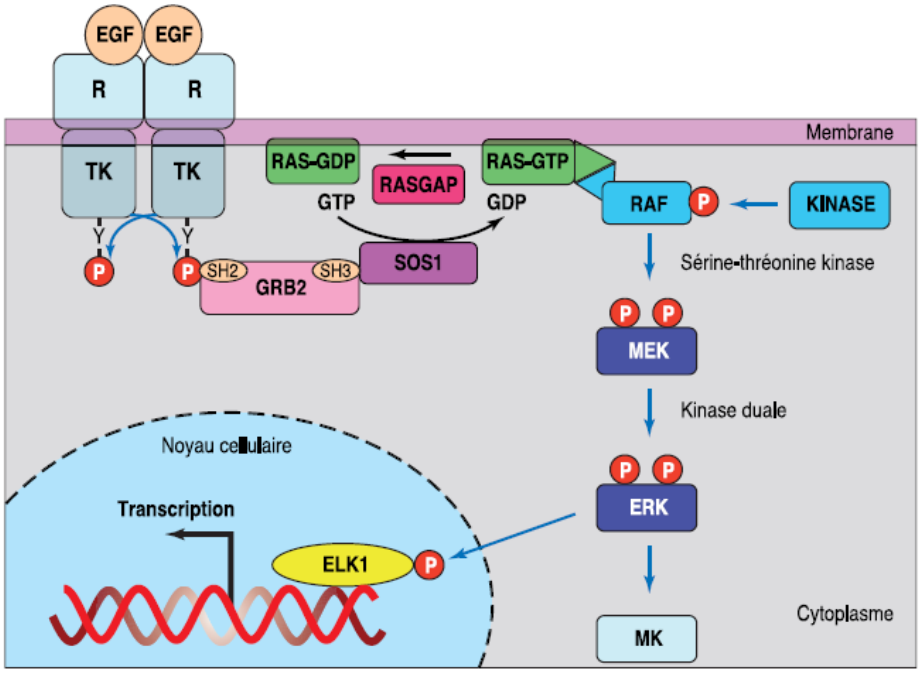


Figure 9 La Voie des MAPKinases. Cette voie de signalisation impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires, en particulier le contrôle de la prolifération cellulaire. Cette voie fait intervenir des effecteurs importants en cancérologie comme RAS, RAF ou encore MEK et ERK. D'après J. Robert (47)

I.2.3. Voie PI3K AKT mTOR

La reconnaissance d'une phosphotyrosine du récepteur activé par une protéine adaptative, va mettre en œuvre la voie PI3K. Cette voie comporte des activations séquentielles de kinases, aboutissant à des effets multiples sur la transcription des gènes impliqués dans la survie, la différenciation ou la prolifération cellulaire (104). Cette voie est interconnectée à la voie des MAPK par le biais de RAS.

PI3K est un hétérodimère composé de deux sous-unités : une sous unité régulatrice (p85, PIK3R1) dotée d'un domaine SH2 permettant la reconnaissance des phosphotyrosines des RTK et une sous unité catalytique (p110, PIK3CA) à activité lipide kinase.

PI3K peut être activée par RAS. Il existe une interconnexion majeure entre PI3K et RAS, ce qui en thérapeutique joue un rôle particulièrement important. PI3K peut également être activée par des récepteurs couplés à des protéines G comme ceux de la famille de la rhodopsine, de la famille des récepteurs de la sécrétine, du glutamate ou encore la famille des récepteurs *Frizzled* (47).

Il existe quatre formes de PI3K dits de Classe I : PIK3CA, PIK3CB, PIK3CC et PIK3CD. Chaque forme possède une spécificité tissulaire et fonctionnelle précise. La sous-unité catalytique de chacune de ces formes se nomme respectivement p110α, p110β, p110γ et p110δ (105). Les PI3Kinases peuvent être activées par un RTK, par une protéine G couplée à un récepteur (GPCR), des cytokines, des intégrines et/ou une protéine RAS. La phosphatase PTEN assure la régulation négative de la voie de PI3K.

La phosphorylation de l'inositide permet le recrutement à la membrane de protéine kinases à domaine PH, en particulier PDK1 et AKT. AKT est à l'origine de l'activation de nombreux effecteurs – ***Figure 10***.

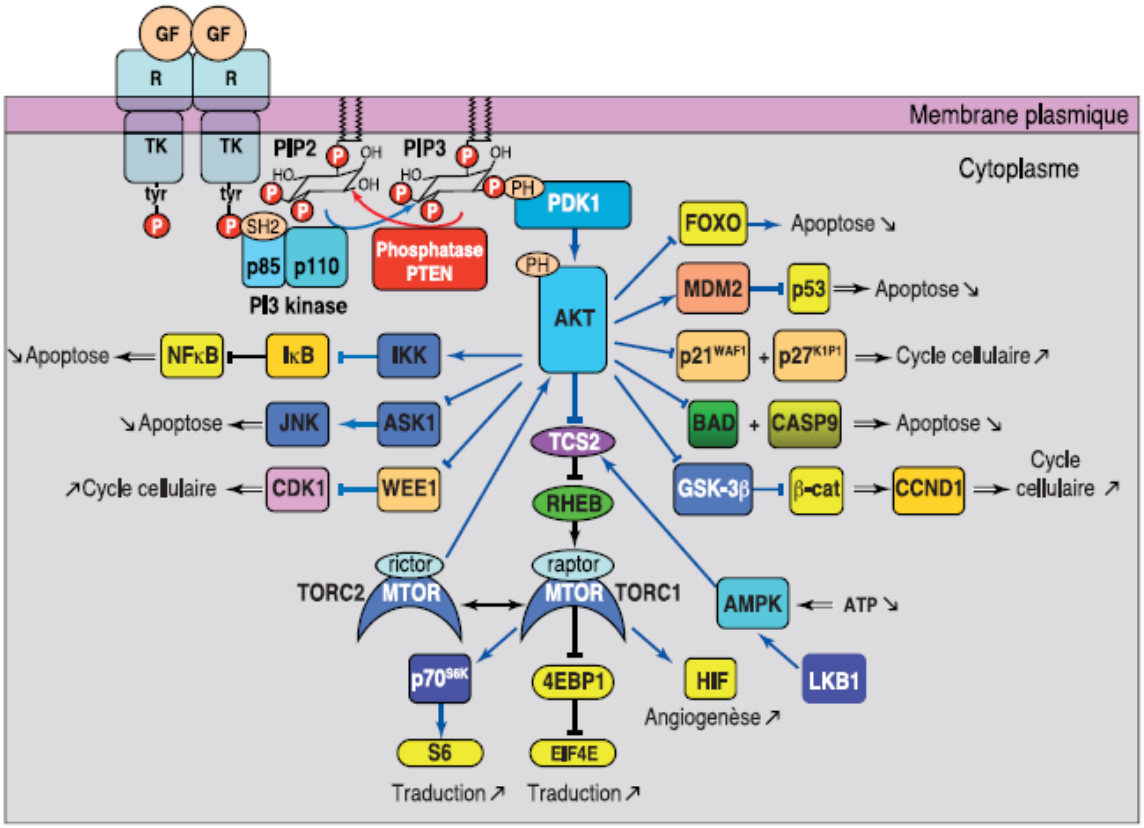


Figure 10 La voie PI3K/AKT/mTOR. Cette voie fait intervenir de nombreuses protéines souvent impliquées dans les processus tumoraux. Le gène *PIK3CA* codant pour la sous-unité catalytique de PI3K est souvent retrouvé muté dans les cancers du sein et dans les cancers colorectaux. La surexpression ou l'absence d'expression de certaines protéines comme par exemple PTEN sont également retrouvées dans de nombreux cancers. *D'après J. Robert* (47).

La voie PI3K joue un rôle très important dans l'oncogenèse. En effet, il existe de nombreuses altérations mutationnelles et non mutationnelles de cette voie. PIK3CA est une oncoprotéine majeure. Elle joue un rôle important dans la diffusion des métastases (106). Sa mutation est fréquemment rencontrée dans les cancers du sein (dans environ 20 à 40% des cas) et dans les cancers du colon (dans environ 8 à 15% des cas).

I.3. Génétique somatique dans les cancers colorectaux métastatiques et implication dans la résistance aux thérapies anti-EGFR

Depuis 2008, il est connu que la réponse aux traitements anti-EGFR est dépendante de la présence de mutation sur les codons 12 ou 13 de *KRAS* (7), cependant, force est de constater qu'une grande partie des patients pour lesquels il n'a pas été retrouvé de mutation, ne répondent pas aux traitements comportant un anti-EGFR.

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

La protéine RAS est une protéine de membrane à activité GTPasique. Elle est impliquée dans la voie des MAPKinases. Il existe 4 isoformes de RAS : KRAS A, KRAS B, NRAS et HRAS, codées par les gènes *KRAS*, *NRAS* et *HRAS*. Il existe un épissage alternatif du gène *KRAS* permettant d'obtenir soit l'isoforme A, soit l'isoforme B de KRAS, ces deux isoformes ayant 85% d'homologie (107).

Le gène *KRAS* se situe sur le chromosome 12 (12p12.1) et est retrouvé muté dans de nombreux cancers. Une grande majorité des mutations de *KRAS* décrites se situent sur les codons 12 et 13 (exon 2) pour des raisons évidentes de recherche systématique depuis 2009 dans le cadre des prescriptions des médicaments anti-EGFR. Les mutations recherchées aujourd'hui sur le gène *KRAS* se situent sur les exons 2, 3 et 4 avec notamment la présence de hotspots sur les codons 12, 13, 59, 61, 117 et 146 correspondant aux sites de liaison au GTP – ***Figure 11***. Il est cependant important de noter que réglementairement pour la prescription d'un anti-EGFR, aucune mutation ne doit être retrouvée sur l'ensemble des exons 2, 3 et 4 et pas uniquement au niveau des hotspots.

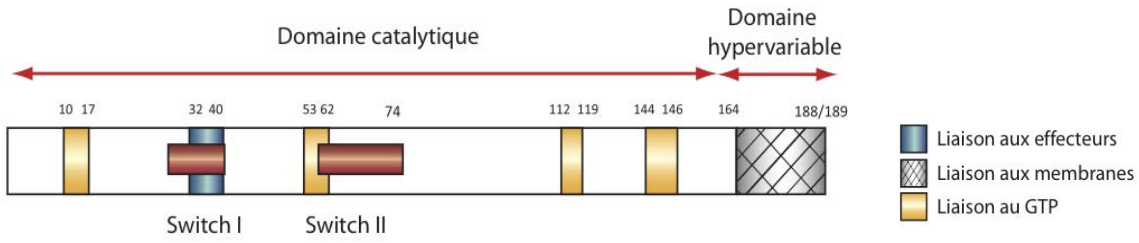


Figure 11 Les sites de liaison au GTP de KRAS sont situés au niveau des codons 10 à 17, 53 à 62, 112 à 119 et 144 à 146. La structure du domaine catalytique est fortement conservée dans tous les isoformes de RAS. Seule la partie variable varie entre les différents isoformes – D'après Pettersen *et al* (103) .

Les mutations sur les exon 2, 3 et 4 de *KRAS* sont présentes respectivement dans environ 42%, 4,3% et 6,7% des cas (27) – ***Figure 12***. Ces mutations sont dites activatrices, c'est à dire qu'en cas de présence de mutation, il y a abolition de l'activité GTPase intrinsèque de KRAS et une accumulation de la formé KRAS liée au GTP (108). La protéine KRAS liée au GTP provoque alors une activation constitutive responsable d'une suractivation de la voie de signalisation des MAPKinases (109).

Le gène *NRAS* est situé sur le bras court du chromosome 1 (1p13.2). *NRAS* est retrouvé muté dans environ 10% des cas, avec comme pour *KRAS* la présence de hotspots sur les codons 12, 13, 59, 61, 117 et 146. La fréquence des mutations sur les exons 2, 3 et 4 de *NRAS* sont de 3,8%, 4,8% et 0,5% respectivement (27) - ***Figure 12***.

La présence d'une mutation sur les exons 2, 3 ou 4 des gènes *KRAS* ou *NRAS* est un facteur reconnu de résistance aux traitements anti-EGFR (27, 28, 30). En Europe, la recherche de mutation sur les exons 2, 3 et 4 des gènes *KRAS* et *NRAS* est ainsi obligatoire pour toute prescription d'un médicament anti-EGFR. La présence d'une mutation, quelle qu'elle soit, sur l'un des exons est une contre-indication à la prescription du cetuximab ou du panitumumab.

	New RAS Total[a]	KRAS Exon 3[a] 59 61	KRAS Exon 4[a] 117 146	NRAS Exon 2[a] 12 13	NRAS Exon 3[a] 59 61	NRAS Exon 4[a] 117 146
OPUS	26.3%	5.9%	9.3%	6.8%	5.1%	0.8%
PICCOLO	9.8%	NR[b]	3.7%[c]	6.3%[d]	NR[b]	NE
20020408	17.6%	4.8%[b]	5.0%	4.2%	3.0%[b]	1.1%
20050181	20.5%	4.6%	7.9%	2.3%	5.8%	0.0%
PRIME	17.4%	3.7%[b]	5.6%	3.4%	4.1%[b]	0.0%
FIRE-3	16.0%	4.3%[b]	4.9%[c]	3.8%	2.0%[b]	0.0%
PEAK	20.1%	4.1%	7.7%	5.4%	5.9%	0.0%
COIN	8.4%	2.1%[b]	NE	0.9%[e]	3.0%[b]	NE
CRYSTAL	14.7%	3.3%	5.6%	3.5%	2.8%	0.9%
SUMMARY[f]	19.9% (16.7%,23.4%)	4.3% (3.3%, 5.5%)	6.7% (5.7%, 7.9%)	3.8% (3.0%, 4.8%)	4.8% (3.4%, 6.8%)	0.5% (0.2%, 1.2%)

Figure 12 Répartition des « nouvelles » mutations de KRAS et NRAS selon les différentes études cliniques publiées à ce jour. Les mutations de l'exon 4 de NRAS restent les moins fréquentes, tandis que les mutations de l'exon 4 de KRAS représentent presque 7% des cas. D'après Sorich *et al.* (27).

I.3.2. Mutations du gènes *BRAF*

Le gène *BRAF* est situé sur le bras long du chromosome 7 en position 34 (7q34). Ce gène code la protéine BRAF, qui se trouve en aval de la protéine KRAS dans la voie des RAS/RAF/MAPKinases. La protéine KRAS est responsable de la phosphorylation de BRAF et de son activation. BRAF fait partie de la famille des protéines RAF formée avec elle de ARAF (codée par le gène *ARAF* situé en Xp11.4-p11.2) et RAF-1, encore appelée C-RAF (codée par le gène *RAF-1* situé en 3p25). De ces trois protéines, BRAF est reconnue comme étant celle possédant la plus grande activité kinase (110, 111).

Selon la base COSMIC, plus de 99% des mutations rapportées du gène *BRAF* concernent le codon 600 (exon 15). Au niveau fonctionnel, des mutations aboutissent à la substitution de la Valine par un autre acide aminé, très fréquemment la Glutamine (mutation V600E). La présence d'une mutation sur le codon 600 confère à la protéine RAF une activité constitutive et provoquant l'activation de la voie RAS/RAF/MAPK (110-112).

Dans les mélanomes métastatiques, la présence d'une mutation V600 sur le gène *BRAF* est reconnue comme un facteur prédictif de réponse aux thérapies anti-BRAF (113). Dans le cancer colorectal métastatique, il n'a pas été établi de relation entre présence de mutation sur le gène *BRAF* et réponse à une thérapeutique ciblée. La présence de mutation est cependant synonyme de mauvais pronostic et d'une survie globale moindre que chez les patients non mutés pour les exons 2, 3 et 4 de *KRAS* et *NRAS* (29).

I.3.3. Mutations du gène *PIK3CA*

Le gène *PIK3CA* se situe sur le chromosome 3 (3q.26.3). Il code la sous-unité catalytique p110α de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K). Un certain nombre de mutations de *PIK3CA* ont été décrites dans la littérature. Dans une minorité de cas, ces mutations sont présentes sur les exons 1, 2, 4, 5, 7, 12, 13 et 18 et dans plus de 80% des cas, elles se situent sur les exons 10 et 21. Des sites hotspots ont été en particulier identifiés, et aboutissent au niveau traductionnel, en particulier à quatre mutations activatrices souvent rencontrées au niveau de trois acides aminés : E542K (l'acide glutamique en 542 est remplacé par la lysine), E545K (l'acide glutamique en 545 est remplacé par la lysine) et H1047L (l'histidine en 1047 est remplacée par la leucine) et H1047R (l'histidine en 1047 est remplacée par l'arginine) (114). Ces mutations touchant l'exon 9 codant pour le domaine hélicoïdal de p110α et l'exon 20 codant la partie catalytique de PI3K, les mutations présentes sur l'exon 9 (E542K et E545K) vont avoir pour conséquence une modification de la conformation du domaine hélicoïdal de p110α et ainsi modifier la régulation de l'activité kinase de PI3K. Les mutations sur

l'exon 20, notamment sur le codon 1047 vont provoquer quant à elles une augmentation de l'activité lipide kinase (115).

Tout comme la présence des mutations V600 de *BRAF*, il semblerait que la présence de mutations de *PIK3CA* soit en faveur d'un mauvais pronostic pour le patient. L'existence entre résistance aux anti-EGFR et présence de mutations de *PIK3CA* a été souvent débattue. Certaines études concluent en effet en faveur d'une relation entre existence de mutation de *PIK3CA*, en particulier sur les exons 9 et 20, et résistance au traitement par cetuximab ou panitumumab (10, 116). D'autres études, reposant sur des cohortes de patients plus anciennes et dont les patients ont été traités indifféremment par cetuximab quel que soit le statut *RAS*, ne retrouvent pas de relation significative entre l'existence de mutation de *PIK3CA* et la réponse au traitement par anti-EGFR (117, 118).

La présence de mutation de *PIK3CA* a également été décrite comme facteur prédictif du risque métastatique. En effet, à l'instar de la présence de mutations *KRAS* dans les cancers colorectaux, la présence de mutation *PIK3CA* est synonyme de plus grand risque vers une évolution vers une maladie métastatique (119).

I.3.4. Plateformes de génétique moléculaire labellisées INCa

La meilleure connaissance des mécanismes moléculaires en cancérologie et le développement de la médecine personnalisée nécessite l'organisation de tests moléculaires de qualité. C'est dans ce sens que l'Institut National du Cancer (INCa) a organisé sur le territoire Français la mise en place de plateformes labellisées dont la mission est d'assurer le diagnostic moléculaire nécessaire pour la prescription des thérapies ciblées et l'accès aux soins et à l'innovation thérapeutique pour l'ensemble de la population Française.

Depuis 2006, un réseau national de 26 plateformes a été mis en place par le ministère de la santé et l'INCa. Ces plateformes, à l'organisation unique au niveau international, ont pour mission la mise en

œuvre des tests moléculaires pour la prescription des thérapeutiques innovantes et dont les biomarqueurs de réponse sont connus. C'est le cas initialement et historiquement de la recherche des translocations *bcr-abl* dans les leucémies myéloïdes chroniques (LMC), mais aussi la recherche de mutations somatiques comme les mutations *BRAF* V600 dans les mélanomes métastatiques, les mutations *EGFR* dans les cancers bronchiques avancés ou encore la recherche des mutations *RAS* dans les cancers colorectaux métastatiques.

Bien que des méthodes marquées CE-IVD existent, c'est à dire des méthodes validées selon les critères de qualité Européens et reconnues pour le diagnostic *in vitro*, aucune règle de standardisation des techniques n'existe à ce jour entre les différentes plateformes. Ainsi, pour le même examen, des techniques différentes sont mises en œuvre selon les laboratoires. Ce manque de standardisation peut parfois paraitre inadapté, mais les résultats des contrôles qualité nationaux tendent à montrer que les plateformes obtiennent dans la quasi majorité des cas les résultats attendus, ce qui montre, à l'instar de ce qui a été démontré dans le STIC MOKAECM (120) pour la recherche des mutations de *KRAS*, qu'aucune technique n'est plus adaptée ou meilleure qu'une autre. Les différences souvent discutées sur les techniques utilisées sont la sensibilité des techniques ainsi que leurs coûts.

Les plateformes de génétique moléculaire sont à la pointe de la recherche moléculaire dans le domaine des thérapeutiques ciblées. Cela nécessite une organisation faisant intervenir les services d'anatomie-cytologie-pathologique et la limite avec la recherche translationnelle est souvent difficile à établir. Afin de mieux répondre aux besoins et à la spécificité de ces tests moléculaires, les plateformes sont souvent organisées en service de biopathologie, avec une unité d'anatomie-cytologie pathologique et unité de biologie moléculaire. Cette organisation permet de limiter les coûts de structure mais également de diminuer les délais de réponse des examens tout en assurant l'expertise conjointe du pathologiste et du biologiste moléculaire. Enfin, une collaboration étroite entre les plateformes et les cliniciens existe dans la quasi majorité des cas, compte tenu de l'aspect

translationnel de cette discipline et de la constante augmentation du nombre de cibles moléculaires à analyser pour la prescription de thérapies ciblées.

La mission des plateformes de génétique moléculaire de l'INCa ne se limite pas à la recherche de marqueurs prédictifs de réponse aux thérapeutiques ciblées. Elles ont aussi comme mission la recherche de facteurs diagnostiques ou pronostiques, ainsi que le monitoring des maladies, comme par exemple la mesure de la maladie résiduelle dans les LMC.

Les plateformes de génétique moléculaire se doivent être à la pointe des développements de la recherche de biomarqueurs. C'est dans ce sens que l'INCa finance un programme de biomarqueurs émergents. Ces biomarqueurs émergents sont des candidats fortement pressentis comme étant des biomarqueurs prédictifs de réponse dont la commercialisation de la thérapeutique ciblée est imminente ou en cours de développement dans des études de Phase II ou III. Ce programme de biomarqueurs émergents a pour vocation de permettre aux plateformes d'être opérationnelles dans les meilleurs délais lors de la validation d'un biomarqueur, qu'il soit prédictif, diagnostique ou pronostique. La recherche de ces altérations permet également l'orientation des patients vers des essais cliniques dont les critères d'inclusion nécessitent la recherche d'altérations moléculaires particulières.

Afin de garantir la plus grand fiabilité des examens, une grande attention est portée à la qualité de l'ensemble des examens effectués dans les plateformes de biologie moléculaire. Depuis la loi du 16 Janvier 2010 relative à l'organisation des soins, l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme ISO 15189 est rendu obligatoire (121). Les objectifs fixés par l'arrêté imposent le rendu de 50% des examens sous accréditation pour 2016, 80% en 2018 et 100% en 2020.

En France, c'est le Comité Français d'Accréditation (COFRAC) qui est en charge de l'évaluation des laboratoires candidats à l'accréditation. Ainsi, le COFRAC évalue sur site les laboratoires afin de s'assurer que les exigences de la norme ISO 15189 sont respectées. Ces exigences sont à la fois organisationnelles, à l'instar de la norme ISO 9001, mais également techniques. Ces exigences techniques imposent notamment la validation méthodes d'examen selon le guide technique

d'accréditation GTA-04 mis à disposition par le COFRAC. La norme étant initialement prévue pour les laboratoires de biologie médicale générale, les méthodes proposées par le COFRAC sont pas ou peu adaptées à la biologie moléculaire. Il est donc important de bien comprendre l'intérêt de chaque paramètre testé (répétabilité, reproductibilité, robustesse, incertitudes, ...) afin de déterminer - avec le matériel biologique disponible souvent rare en biologie moléculaire, ainsi qu'en optimisant les coûts d'examen souvent élevés dans notre discipline - la signification de ces paramètres au niveau du résultat final et également maitriser leurs variations afin de garantir la fiabilité du résultat rendu aux cliniciens. Les résultats obtenus lors de la validation de méthode sont reportés dans un dossier de validation et font l'objet d'un examen par le COFRAC lors des visites d'accréditation. En parallèle, le laboratoire se doit de mettre en œuvre une politique de contrôle qualité interne et externe afin de s'assurer en permanence de la validité et de la qualité de ses résultats.

Le respect des normes d'accréditation est un gage de qualité et d'assurance de la validité des résultats. Cette sécurité sur le rendu des résultats est primordiale, surtout lorsque l'on considère que le résultat d'un examen va conditionner directement la prise en charge médicale et le traitement du patient atteint de cancer.

I.4. Objectifs du travail

Ce travail comporte trois objectifs.

Le premier objectif consiste à améliorer les techniques déjà existantes pour la recherche des mutations de *RAS*, *BRAF* et *PIK3CA*, compte tenu de leur importance dans le choix des traitements et de leur valeur diagnostique et pronostique.

Le second objectif de ce travail consiste en la validation de ces techniques au regard des normes en vigueur. En effet, tout laboratoire effectuant des examens à visée diagnostique a pour obligation l'accréditation de son activité pour au moins 50% pour 2016 et 100% en 2020. Les standards n'existant pas pour les techniques de biologie moléculaire des tumeurs utilisées en routine, les protocoles de validation de méthodes selon les exigences imposées par la norme ont du être établis.

Le troisième objectif consiste à étudier d'autres biomarqueurs pouvant être impliqués dans la résistance aux traitements anti-EGFR. Une étude au niveau fonctionnel des formes phosphorylées des principales protéines en aval de l'EGFR est ainsi envisagée.

Chapitre II

Intérêt des biomarqueurs en cancérologie et validation technique des méthodes de biologie moléculaire pour la détection des mutations somatiques des gènes *RAS* et *PIK3CA*

II. Intérêts des biomarqueurs en cancérologie et validation des techniques de biologie moléculaire pour la détection des mutations somatiques des gènes *RAS* et *PIK3CA*

Dans ce chapitre sont développés les pré-requis à mon travail sur la recherche de nouveaux biomarqueurs prédictifs de réponses aux thérapies anti-EGFR, correspondant au premier objectif de mon travail.

Le premier article intitulé « Biomarqueurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées en oncologie » est une synthèse sur les connaissances actuelles sur les biomarqueurs prédictifs validés en oncologie et pour lesquels des examens sont réalisés en routine.

Le second article intitulé « Optimization of routine KRAS mutation PCR-based testing procedure for rational individualized first-line targeted therapy selection in metastatic colorecal cancer » est une comparaison entre différentes techniques de détection des mutations du gène *KRAS* avec une proposition d'un workflow plus adapté à la routine diagnostique.

Le troisième article intitulé « Comparison of Cobas 4800 KRAS, TaqMan PCR and High Resolution Melting PCR assays for the detection of KRAS somatic mutations in foramlin-fixed paraffin embedded colorectal carcinomas. » présente une nouvelle méthode innovante marquée CE-IVD permettant la détection des mutations des exons 12, 13 et 61 du gène KRAS. Cette technique est ensuite comparée à deux autres méthodes fréquemment utilisées dans les plateformes de génétique moléculaire.

Le dernier article de ce chapitre, intitulé « Analysis of PIK3CA exon 9 and 20 mutations in breast cancers using PCR-HRM and PCR-ARMS: Correlation with clinicopathological criteria » décrit une méthode de détection des mutations du gène *PIK3CA* développée au laboratoire pour étudier les caractéristiques de tumeurs mammaires. Cette technique est transposable pour l'analyse des cancers colorectaux métastatiques et c'est à ce titre qu'elle a été intégrée dans ce mémoire.

Ces quatre études constituent une base solide pour l'objectif de mon travail qui est d'étudier les caractéristiques moléculaires des tumeurs de patients atteints de cancers colorectaux métastatiques et traités par anti-EGFR.

II.1. Biomarqueurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées en oncologie

Plusieurs biomarqueurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées ont été décrits et sont aujourd'hui recherchés en routine pour la prescription de certaines de ces molécules. Les plateformes de génétique moléculaire de l'Institut National du Cancer (INCa) sont responsables de l'analyse de ces biomarqueurs. Un article de revue a été publié en 2013 (Harlé A., Merlin J.L. Biomarqueurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées en oncologie. *Annales de Biologie Clinique. 2013 Nov 1;71:89-97*) visant à établir une synthèse sur la liste des biomarqueurs validés par l'INCa et les méthodes habituellement utilisées pour leur détermination, ainsi que les probables évolutions des techniques et des prélèvements utilisés pour les recherches de biomarqueurs.

Résumé

Le cancer tue chaque année 147 500 personnes en France d'après le dernier rapport de l'Institut National du Cancer (INCa). Le développement des thérapies personnalisées et plus récemment de la théranostique a complètement modifié l'approche biologique de cette maladie. Ainsi, aux marqueurs sériques déjà bien connus mais peu spécifiques, viennent s'ajouter de nombreux marqueurs tumoraux prédictifs de la résistance ou de la réponse à une thérapie ciblée. L'étude de ces biomarqueurs s'effectue par différentes approches techniques, relevant essentiellement de la biologie moléculaire. Ces déterminations biologiques sont réalisées en France au sein des 28 plateformes de génétique moléculaire des tumeurs labélisées par l'INCa.

Les techniques les plus utilisées pour ce type de diagnostic moléculaire reposent sur l'utilisation de prélèvements tumoraux fixés au formol et inclus en paraffine, ce qui rend les déterminations

relativement difficiles, notamment lors de la réalisation de techniques comme la PCR en temps-réel, le séquençage, l'immunohistochimie, ou les techniques d'hybridation *in situ* (FISH ou CISH).

Cet article établit une synthèse sur les biomarqueurs validés en théranostique ainsi que les méthodes diagnostiques les plus utilisées, mais également sur les biomarqueurs candidats à venir et les évolutions proches comme l'utilisation de biopsies liquides.

ANNALES DE BIOLOGIE CLINIQUE

Synthèse

Ann Biol Clin 2013 ; 71 (spécial 1) : 89-97

Biomarqueurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées en oncologie

Response predictive biomarkers to targeted therapies in oncology

Alexandre Harlé[1,2,3]
Jean-Louis Merlin[1,2,3]

[1] Service de Biopathologie, Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

[2] CNRS, UMR 7039 CRAN, Nancy, France

[3] Université de Lorraine, Nancy, France
<a.harle@nancy.unicancer.fr>

Résumé. Le cancer tue chaque année 147 500 personnes en France. Le développement des thérapies personnalisées et plus récemment de la théranostique a complètement modifié l'approche biologique de cette maladie. Ainsi, aux marqueurs sériques déjà bien connus mais peu spécifiques, viennent s'ajouter de nombreux marqueurs tumoraux prédictifs de la résistance ou de la réponse à une thérapie ciblée. L'étude de ces biomarqueurs s'effectue par différentes approches techniques, relevant essentiellement de la biologie moléculaire. Ces déterminations biologiques sont réalisées en France au sein des 28 plateformes de génétique moléculaire des tumeurs labélisées par l'Institut national du cancer (INCa). Les techniques les plus utilisées pour ce type de diagnostic moléculaire reposent sur l'utilisation de prélèvements tumoraux fixés au formol et inclus en paraffine, ce qui rend les déterminations relativement difficiles, notamment lors de la réalisation de techniques comme la PCR en temps réel, le séquençage, l'immunohistochimie, la FISH ou la CISH. Cet article établit une synthèse sur les biomarqueurs validés en théranostique ainsi que les méthodes diagnostiques les plus utilisées, mais également sur les biomarqueurs candidats à venir et les évolutions proches comme l'utilisation de biopsies liquides.

Mots clés : *biomarqueurs, théranostique, thérapies ciblées*

Abstract. Cancer kills 147,500 people each year in France. The development of personalized therapies and more recently theranostics, completely changed the biological approach to this disease. Thus, the already well-known but sparsely specific serum markers are being replaced by new tumor markers, predictive of resistance or response to targeted therapies. The study of these biomarkers is performed by different technical approaches, which are essentially based molecular biology assays. These determinations are assessed in France within the 28 molecular tumor genetics platforms approved by French National Cancer Institute (INCa). The most commonly used assays for this type of molecular diagnostics, such as real-time PCR, the sequencing, immunohistochemistry, FISH or CISH, are relatively difficult because most of them are based on the use of formalin fixed paraffin embedded tumor tissues. This paper provides a synthesis of validated theranostic biomarkers and the most used diagnostic methods, but also draw a point on the best incoming biomarkers candidates and assays in close development using liquid biopsies.

Key words: *biomarkers, theranostic, targeted therapies*

Tiré à part de l'auteur

doi:10.1684/abc.2013.0906

Tirés à part : A. Harlé

Pour citer cet article : Harlé A, Merlin JL. Biomarqueurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées en oncologie. *Ann Biol Clin* 2013 ; 71(spécial 1) : 89-97
doi:10.1684/abc.2013.0906

© John Libbey Eurotext, 2013

Synthèse

Le cancer tue chaque année 147 500 personnes en France d'après les dernières estimations de l'Institut national du cancer (INCa) [1]. Le développement des thérapies personnalisées et plus récemment de la théranostique a complètement modifié l'approche biologique de la maladie cancéreuse. Ainsi, aux marqueurs sériques anciens et peu spécifiques comme par exemple CA-125, ACE, CA 19-9 ou encore CA 15-3 viennent aujourd'hui s'ajouter de nombreux marqueurs tumoraux, plus représentatifs de la maladie et surtout prédictifs de la résistance ou de la réponse à une thérapie ciblée, associée ou non à une chimiothérapie traditionnelle.
L'étude de ces biomarqueurs s'effectue par différentes approches techniques, relevant essentiellement de la biologie moléculaire. Ces déterminations biologiques sont réalisées en France au sein des 28 plateformes de génétique moléculaire des tumeurs labélisées par l'INCa. Les déterminations sont effectuées principalement sur des biopsies de tumeurs primitives ou des métastases, fixées au formol, puis incluses en paraffine. La fixation et l'inclusion permettent de conserver les échantillons plusieurs années en limitant les processus de dégradation. Cependant, cette spécificité rend les tests de biologie moléculaire (i.e. étude de l'ADN ou des ARN, immunohistochimie, hybridation *in situ*...) plus difficiles à effectuer que sur des prélèvements frais, notamment à cause de la fragmentation et de la détérioration des molécules d'ADN induites par la fixation [2].

Développement de la médecine personnalisée et biomarqueurs validés en thérapeutique

Historiquement, le premier couple thérapie ciblée/biomarqueur validé, est le couple hormonothérapie/statut des récepteurs hormonaux dans les cancers du sein. En effet, la réponse à l'hormonothérapie chez la femme atteinte de cancer du sein est connue depuis 1948 [3], mais c'est seulement dans les années 1970 que le lien entre la présence de récepteurs hormonaux et la réponse aux traitements antihormonaux a été décrite [4]. C'est bien plus tard, dans le début des années 2000 que le développement de la médecine personnalisée et que les thérapeutiques ciblées ont pris de l'ampleur. Ce développement s'est effectué notamment au travers d'études cliniques internationales de phase III, ayant prouvé l'efficacité d'anticorps monoclonaux ou d'inhibiteurs de kinase, ciblant spécifiquement certains récepteurs particulièrement exprimés au niveau des tumeurs ou ciblant des voies de signalisation suractivées dans certaines pathologies cancéreuses. En 2013, sept biomarqueurs sont reconnus par l'INCa en vue d'une prescription d'une thérapie ciblée (*tableau 1*). Le statut de ces biomarqueurs doit obligatoirement être déterminé avant la prescription de thérapies ciblées.
C'est le cas par exemple du trastuzumab dans le traitement des cancers du sein métastatiques [5]. Cet anticorps monoclonal cible spécifiquement le récepteur HER2 (*human epidermal growth factor receptor* de type 2) et a démontré son efficacité chez les patientes atteintes de cancer du sein métastatique dont les tumeurs surexpriment ce type de récepteur, soit environ 15 à 20 % des cas [6]. La recherche de cette surexpression est également obligatoire pour la prescription d'un autre anticorps monoclonal interagissant avec HER2, le pertuzumab [7]. La détermination du statut HER2 s'effectue principalement par des techniques d'immunohistochimie, ainsi que par FISH et CISH. À ce titre, dix tests compagnons sont officiellement agréés par la FDA pour la détermination du statut HER2 d'une tumeur (*tableau 2*). D'autres kits sont également disponibles en France, dont certains sont marqués CE-IVD. Il est intéressant de noter que les tests d'amplification de HER2 sont également obligatoires dans les contextes de cancer de l'estomac pour la prescription de trastuzumab chez les patients dont les tumeurs expriment HER2 [8].
Dans les cancers colorectaux métastatiques, deux molécules ciblant EGFR (*epidermal growth factor receptor*), sont utilisées : le panitumumab et le cetuximab. Ces deux molécules peuvent être utilisées en association à une chimiothérapie à base de platine (Folfox) [9] ou d'irinotecan (Folfiri) [10]. L'apport du cetuximab sur la survie globale et la survie sans progression des patients était décrite comme significative dans les études préliminaires. En 2008, une équipe française a établi un lien entre présence de mutation sur l'exon 2 (codons 12 ou 13) du gène *KRAS* et résistance au cetuximab [11]. Les analyses des études d'enregistrement du cetuximab ont donc été effectuées à nouveau en tenant compte de ce paramètre biologique, au même titre qu'elles avaient déjà été réalisées avec le panitumumab [12] et il apparaît alors que 60 % des patients possédant une tumeur avec un gène *KRAS* sauvage pour les codons 12 ou 13 bénéficient du traitement par anti-EGFR, contre 40 % dans les études ne faisant pas la distinction entre *KRAS* sauvage et *KRAS* muté [13]. Le génotypage de l'exon 2 du gène *KRAS* est donc devenu obligatoire avant toute prescription de cetuximab ou de panitumumab. Très récemment, les résultats de l'essai PRIME visant à étudier la réponse à la chimiothérapie associant panitumumab et FOLFOX, a permis de mettre une évidence une augmentation significative de la survie globale chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique et dont les tumeurs ne portaient aucune mutation sur les codons 12 et 13 (exons 2), 59 et 61 (exon 3) et 117 et 146 (exon 4) des gènes *KRAS* et *NRAS* [14]. L'AMM du panitumumab a ainsi été modifiée en Juillet 2013 et la prescription de cette

Tiré à part auteur

© John Libbey Eurotext, 2013

Tableau 1. Biomarqueurs validés en 2013, dont la détection est effectuée à visée thérapeutique. Ces biomarqueurs sont reconnus par l'INCa et la FDA.

Biomarqueur	Indication	Molécule associée
Amplification de HER2	Cancer du sein métastatique	Trastuzumab Lapatinib Pertuzumab
Amplification de HER2	Cancer de l'estomac	Trastuzumab
Mutation de ***KRAS*** et ***NRAS*** *(Exon 2, codons 12 et 13, Exon 3, codons 59 et 61, Exon 4, codons 117 et 146)*	Cancer colorectal métastatique	Cetuximab Panitumumab
Mutation de *EGFR* (exons 17, 19, 20 et 21)	Adénocarcinome pulmonaire	Gefitinib Erlotinib
Fusion de *ALK*	Adénocarcinome pulmonaire	Crizotinib
Mutation *BRAF* (exon 15, V600E)	Mélanome métastatique	Vemurafenib
Mutations cKIT et *PDGFRA* (exons 9 et 11)	Tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST)	Imatinib
Fusion *BCR-ABL* (détection, quantification et mutations)	LMC et LAL Ph+	Imatinib Nilotinib Dasatinib

molécule nécessite désormais un génotypage *KRAS*, mais également *NRAS*. Les résultats de l'essai FIRE-3 présentés au congrès de l'ESMO en Septembre 2013 ont confirmé les mêmes résultats avec les chimiothérapies associées au Cetuximab, avec là aussi un intérêt de la recherche des mutations des exons 2, 3 et 4 des gènes *KRAS* et *NRAS*. Les génotypages *KRAS* et *NRAS* s'effectuent par différentes méthodes permettant d'obtenir des informations sur la séquence du gène. Les techniques les plus fréquentes utilisent la PCR temps-réel, comme la PCR TaqMan, PCR HRM, PCR TaqMelt [15, 16] (*tableau 3*), mais aussi des techniques de séquençage de type Sanger et de plus en plus aujourd'hui, de séquençage de nouvelle génération, plus sensible et plus fiable que les techniques de séquençage capillaire traditionnelles [17]. Ces techniques sont effectuées après extraction d'ADN tumoral depuis un bloc de tissu fixé au formol et inclus en paraffine (*figure 1*). Bien que certains kits commercialisés soient marqués CE-IVD, une étude menée en France a validé qu'aucune technique par rapport à une autre ne donnait de meilleurs résultats [18], il appartient donc à chaque laboratoire de travailler selon ses propres références en considérant la qualité de l'examen effectué au sein de leur laboratoire et du rapport bénéfice/coût. Il a cependant été démontré récemment que le test compagnon officiel du cetuximab ne permettait pas la détection de 17 % des mutations pertinentes de *RAS* [19].

Dans les adénocarcinomes pulmonaires, le nombre de biomarqueurs continue de s'étoffer jour après jour. Ainsi, dans sa dernière publication sur les biomarqueurs émergents [20], l'INCa souligne l'importance des mutations de gènes comme *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, HER2 et également des translocations *EML4-ALK*. Les biomarqueurs dont le statut est obligatoire avant prescription d'une thérapie ciblée sont cependant au nombre de deux dans cette pathologie. Il a été montré notamment que le statut mutationnel du gène *EGFR* avait une importance toute particulière dans la réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase l'erlotinib et le gefitinib. Ainsi, chez les patients dont les tumeurs possèdent un gène *EGFR* muté sur les exons 17, 19, 20 ou 21, le gefitinib seul est supérieur à l'association standard carboplatine-paclitaxel [21]. La prescription d'erlotinib en première ligne n'est possible qu'en cas de présence d'une mutation du gène *EGFR* sur les mêmes exons [22]. Il est cependant important de noter que certaines mutations du gène *EGFR* confèrent une résistance naturelle à ces deux molécules, les plus fréquentes de ces mutations étant D761Y (exon 19) et la T790M (exon 20) avec des fréquences respectives de 1 et 5 %. La recherche des mutations du gène *EGFR* peut être effectuée, à l'aide de techniques de PCR temps réel, mais il semble de plus en plus important de pouvoir détecter spécifiquement les mutations conférant des résistances aux traitements, c'est pourquoi une technique permettant l'identification des mutations est à préférer (PCR spécifique d'allèle ou séquençage). Plus récemment, le crizotinib, un inhibiteur de protéine kinase, a démontré son efficacité chez les patients atteints d'un adénocarcinome pulmonaire et dont les tumeurs présentaient une fusion du gène *ALK* [23]. Cette fusion de *ALK*, en particulier avec le gène *EML4* ou avec le gène *NPM* a pour effet une augmentation de l'activité kinase de la cellule et se traduit généralement par une amplification de *ALK*. Cette amplification de *ALK* peut se détecter en qPCR ou la surexpression de la protéine par immunohistochimie. Les translocations quant à elles sont détectables par technique de FISH.

© John Libbey Eurotext, 2013

Tirés à part auteur

Synthèse

Tableau 2. Tests compagnons autorisés par la FDA en 2013. Il est important de noter qu'il n'existe aucune obligation en France d'utiliser spécifiquement ces tests compagnon. Il est cependant nécessaire de remédier à une méthode validée et procéder à des contrôles qualité internes et externes.

Molécule	Kit commercialisé	Fabriquant	Principe
Cetuximab	Therascreen KRAS RGQ PCR Kit	Qiagen Manchester, Ltd	Détection qualitative en PCR temps-réel de 7 mutations de *KRAS* utilisant de l'ADN extrait de tissus fixés au formol et inclus en paraffine
Cetuximab Panitumumab	Dako EGFR PharmDx Kit	Dako North America, Inc	Test qualitatif d'immunohistochimie permettant la détection de l'expression de *EGFR*
Imatinib	Dako C-KIT PharmDx	Dako North America, Inc	Test qualitatif d'immunohistochimie permettant l'identification de la protéine c-kit/antigène CD 117
Trastuzumab	Inform HER-2/NEU	Ventana Medical Systems, Inc	Test qualitatif FISH pour la détection de la surexpression de HER2
Trastuzumab	Pathvysion HER-2 DNA Probe Kit	Abbott Molecular Inc	Test qualitatif FISH pour la détection de la surexpression de HER2
Trastuzumab	Pathway anti-HER-2/NEU (4B5) rabbit monoclonal primary antibody	Ventana Medical Systems, Inc	Test qualitatif d'immunohistochimie pour la détection de la surexpression de HER2
Trastuzumab	Insite HER-2/NEU KIT	Biogenex Laboratories, Inc	Test qualitatif d'immunohistochimie pour la détection de la surexpression de HER2
Trastuzumab	Spot-Light HER2 CISH Kit	Life Technologies, Inc	Test quantitatif CISH pour la détection de la surexpression de HER2
Trastuzumab	Bond Oracle Her2 IHC System	Leica Biosystems	Test semi-quantitatif d'immunohistochimie pour la détection de la surexpression de HER2
Trastuzumab	HER2 CISH PharmDx Kit	Dako Denmark A/S	Test quantitatif CISH pour la détection de la surexpression de HER2
Trastuzumab	Inform HER2 Dual ISH DNA probe cocktail	Ventana Medical Systems, Inc	Test permettant le calcul du ratio HER2/chromosome 17 utilisant l'hybridation *in situ* et un mélange de différentes sondes
Trastuzumab Pertuzumab	Herceptest	Dako Denmark A/S	Test semi-quantitatif d'immunohistochimie pour la détection de la surexpression de HER2
Trastuzumab Pertuzumab	HER2 FISH PharmDx Kit	Dako Denmark A/S	Test quantitatif FISH pour la détection de l'amplification de HER2
Tramatenib Dabrafenib	THxID™ BRAF Kit	BioMérieux Inc	Détection qualitative en PCR temps réel des mutations V600E et V600K de *BRAF* utilisant de l'ADN extrait de tissus fixés au formol et inclus en paraffine
Erlotinib	Cobas EGFR mutation test	Roche Molecular Systems, Inc	Détection en PCR temps réel des mutations *EGFR* utilisant de l'ADN extrait de tissus fixés au formol et inclus en paraffine
Crizotinib	VYSIS ALK Break Apart FISH Probe Kit	Abbott Molecular Inc	Détection des réarrangements de *ALK* par méthode de FISH
Vémurafenib	Cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test	Roche Molecular Systems, Inc	Détection qualitative des mutations *BRAF* V600 utilisant de l'ADN extrait de tissus fixés au formol et inclus en paraffine

Dans les cas de mélanomes métastatiques, le vémurafenib a obtenu son AMM en France en 2012 suite aux résultats de l'étude de phase III [24]. Cet inhibiteur de BRAF, une protéine sérine/thréonine kinase, a la particularité de n'être actif que chez les patients dont les tumeurs portent une mutation de *BRAF* en position 600 de l'exon 15, une mutation de type V600. Ainsi, la détection de cette mutation est obligatoire avant toute prescription de vémurafenib. La détection de cette mutation est effectuée à partir d'un prélèvement caractéristique de la tumeur, fixé au formol et inclus en paraffine. La détection, tout comme *KRAS* ou *EGFR*, peut être effectuée de différentes manières, notamment en PCR ou en séquençage. Certaines études ont également démontré l'intérêt de l'immunohistochimie pour la détection de cette anomalie [25].

L'étude des mutations de *KIT* et de *PDGFRA* a quant à elle un intérêt dans le traitement des tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) [26]. La présence de mutations sur *KIT* ou *PDGFRA* correspond à un gain de fonction c'est-à-dire à une augmentation de l'activité kinase. Ces mutations sont présentes dans environ 85 % des cas de GIST, les plus fréquentes étant celles de l'exon 11 de *KIT*. La présence de

© John Libbey Eurotext, 2013

Thèse à part entière

Tableau 3. Principales techniques de biologie moléculaire utilisées en théranostique.

Technique	Principe et spécificité	Commentaire
PCR TaqMan	PCR temps réel spécifique d'allèle	Spécifique d'une mutation pour laquelle une sonde est dessinée
PCR TaqMelt	PCR temps réel non spécifique	Permet la détection de mutations sur un exon particulier
PCR HRM	PCR temps réel non spécifique	Permet la détection de mutations sur un exon particulier
PCR ARMS Scorpion	PCR temps réel spécifique d'allèle	Spécifique d'une mutation pour laquelle une sonde est dessinée
Séquençage Sanger	Séquençage capillaire permettant la détection spécifique des mutations	Méthode spécifique mais souvent associée à une faible sensibilité
Séquençage SNaPshot	Séquençage capillaire permettant la détection spécifique des mutations	Système de séquençage capillaire plus sensible que la méthode Sanger
Pyroséquençage	Séquençage direct pouvant être bidirectionnel et permettant la détection spécifique des mutations	Permet le séquençage avec une sensibilité satisfaisante
Séquençage par technologie utilisant des semi-conducteurs	Séquençage direct pouvant être bidirectionnel et permettant la détection spécifique des mutations	Permet le séquençage avec une sensibilité satisfaisante et une large couverture de lecture
Séquençage par technologie MassArray SNP Multiplex	Détection de masse spécifique : détermination de la masse des allèles de chaque SNP par spectrométrie de masse	Permet l'interrogation de 20 à 28 SNP sur une centaine ou plusieurs milliers d'échantillons
Séquençage par synthèse	Séquençage parallèle massif par synthèse chimique, permettant la détection spécifique des mutations	Technologie très haut débit, permettant le séquençage simultané de plusieurs millions de fragments

mutations sur l'exon 9 de *KIT*, assez rares, est une indication de doublement de posologie d'une thérapie ciblée, l'imatinib, tandis que la présence de mutations sur l'exon 11 est plutôt synonyme de bonne réponse à cette thérapie à posologie standard [27]. La présence d'une mutation D842V de *PDGFRA* est quant à elle synonyme de résistance à l'imatinib [28]. Là aussi, différentes approches de biologie moléculaire sont envisageables, aussi bien en immunohistochimie, PCR temps-réel ou séquençage.

Enfin, le seul biomarqueur reconnu par l'INCa en onco-hématologie, à ce jour est le transcrit *BCR-ABL* dans le cadre des leucémies myéloïdes chroniques (LMC) et des leucémies aiguës lymphoïdes chromosome Philadelphie positive (LAL Ph+). Cette anomalie chromosomique consistant en une translocation réciproque 9:22 des gènes *BCR* et *ABL* [29, 30] entraîne l'expression d'un gène de fusion *BCR-ABL* dont la protéine chimérique résultante possède une forte activité tyrosine kinase. Ainsi, le diagnostic moléculaire, notamment la détection du chromosome de Philadelphie pour le diagnostic, mais ensuite le taux de transcrits *BCR-ABL* en fait un biomarqueur de choix pour le diagnostic, d'une part, et le suivi de la maladie et de la réponse au traitement par imatinib, d'autre part [31]. Les techniques de détection de la translocation *BCR-ABL* utilisent essentiellement la FISH [32], tandis que la RT-PCR reste le moyen le plus sensible et fiable pour l'étude des transcrits *BCR-ABL* [33].

Les biomarqueurs émergents

À cette liste de biomarqueurs recherchés en routine pour une application clinique directe, viennent s'ajouter bon nombre d'autres candidats potentiels.

Il semblerait également qu'en plus de la recherche des mutation sur les gènes KRAS et *NRAS*, le gène *PIK3CA* ait un intérêt dans la prédiction de réponse aux traitements associant le cetuximab à une chimiothérapie [34].

Dans les cancers du sein, *PIK3CA* semble également un candidat intéressant. Ce gène codant pour le site actif de la phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K) a montré son intérêt pronostique, puisqu'il apparaît une corrélation entre grade SBR de la maladie et présence de mutations de *PIK3CA* [35], mais également un intérêt prédictif de la réponse aux thérapies ciblées déjà utilisées dans le traitement des cancers du sein surexprimant HER2, comme le trastuzumab ou le lapatinib [36, 37], ainsi qu'aux traitements à venir ciblant la voie PI3K/AKT/mTOR.

Les mutations *BRAF*, dans le contexte de mélanomes métastatiques, auraient également un intérêt supplémentaire puisque l'action d'un anti-MEK, le trametinib, en association avec un anti-BRAF, le dabrafenib, se révèle être dépendante du statut mutationnel *BRAF* de la tumeur. Ainsi, les patients présentant des tumeurs portant une mutation *BRAF* de type V600 bénéficient de l'association de ces deux molécules [38].

© John Libbey Eurotext, 2013

Tirage à part de l'auteur

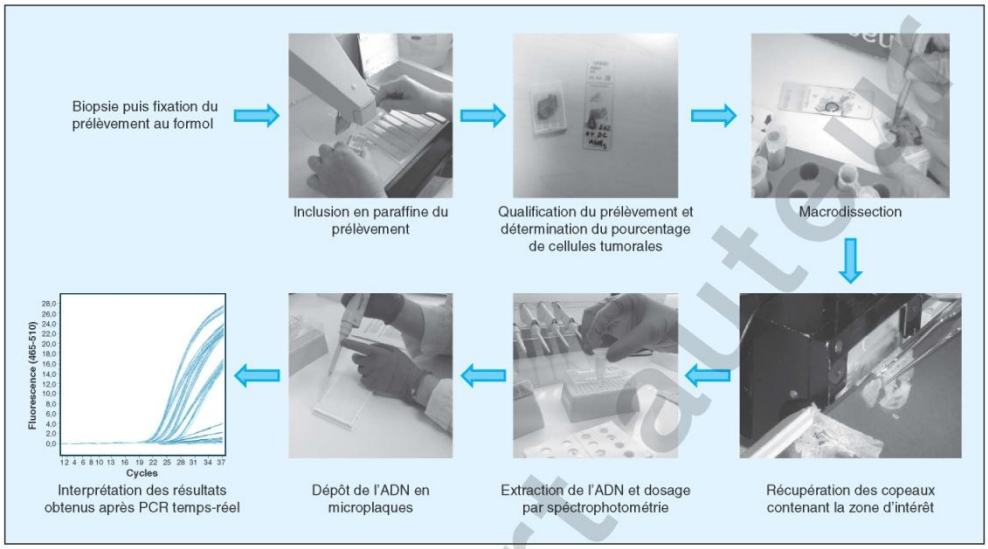


Figure 1. Workflow pour la détermination du génotype tumoral KRAS par méthode PCR TaqMan.

Enfin, on assiste depuis quelque temps à une nouvelle manière de penser la maladie cancéreuse. En effet, l'approche classique se veut par organe, mais de nouvelles réflexions sont en route pour une approche par anomalie moléculaire. Le protocole clinique Safir (Fabrice André, Gustave Roussy), étudie ainsi la possibilité d'aiguiller les patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique vers des essais cliniques proposant des thérapies ciblées en fonction des anomalies moléculaires présentes au niveau de la tumeur. Le protocole Shiva (Christophe Le Tourneau, Institut Curie) étudie l'efficacité d'un traitement basé sur le profil moléculaire de la tumeur, quelle qu'elle soit, versus un traitement conventionnel chez des patients ayant un cancer réfractaire. Aussi, les gènes *MET, ALK, ROS1* ou encore *BRAF* sont des candidats actuellement étudiés dans de nombreux types de cancers, pour leur implication dans la réponse à des thérapies ciblées connues, ayant déjà fait leurs preuves sur certains organes, mais sur d'autres types de cancers. Dans ce contexte, certains essais cliniques en cours proposent d'administrer le crizotinib, habituellement utilisé dans les adénocarcinomes pulmonaires avec réarrangement de *ALK*, chez les patients présentant un cancer quel qu'il soit, à condition qu'une anomalie de *ALK* ou de *MET* soit détectée. La même approche est utilisée pour les cancers présentant une mutation V600 de *BRAF* et l'utilisation du vémurafenib. Ces essais dont la promotion est assurée par Unicancer ont été baptisés « ACSé » pour Accès sécurisé à des thérapies ciblées innovantes, sont rendus possibles par la mise en place, sous l'égide de l'INCa, d'un réseau de plateformes permettant la réalisation de ces analyses moléculaires. Cette approche par anomalie moléculaire n'en est encore qu'à ses débuts et il faudra attendre quelques années pour connaître les résultats de ces études et peut-être ouvrir une nouvelle ère de la médecine personnalisée, mettant ainsi le diagnostic moléculaire au centre de la prise en charge des patients atteints de cancers.

Cette multiplication du nombre de gènes à étudier ne pourra cependant se faire sans le développement du séquençage nouvelle génération ou NGS (*next generation sequencing*). Le problème principal rencontré par le biologiste faisant de la biologie des tumeurs est celui du manque de matériel tumoral. Il n'est pas rare de devoir tester aujourd'hui 5 à 6 gènes sur une biopsie de quelques millimètres. Mais, les prélèvements sont difficiles à obtenir, car invasifs pour les patients et surtout, ces prélèvements doivent être réalisés avant tout traitement pouvant léser l'ADN, comme la radiothérapie par exemple. Ainsi, il n'est pas rare d'avoir très peu de matériel tumoral et à défaut de pouvoir réaliser tous les tests de mutations, une hiérarchisation des examens est nécessaire, le recours à une nouvelle biopsie étant rarement acceptable. Beaucoup d'approches actuelles nécessitent une technique par gène et cela est évidemment consommateur d'ADN. De plus en plus de laboratoires français s'équipent maintenant de séquenceurs dits de

© John Libbey Eurotext, 2013

Tirés à part autem

nouvelle génération permettant, à partir d'une dizaine de nanogrammes d'ADN, d'obtenir les séquences d'un grand panel de gènes en une seule analyse et surtout à moindre coût et pour un nombre de manipulations techniques limité [39, 40]. Le problème majeur de ces systèmes reste cependant la taille des données générées, aussi bien au niveau de l'interprétation des résultats qui souvent doit être réalisée par un bioinformaticien, mais également du stockage informatique de ces données, puisque plusieurs gigaoctets de data sont générés à chaque analyse.

L'avenir proche : les biomarqueurs circulants

Afin de pallier le manque de matériel tumoral, des solutions alternatives sont en cours de développement. Il est possible de réaliser aujourd'hui des biopsies liquides, c'est-à-dire d'être en mesure de détecter de l'ADN tumoral circulant, à partir d'un simple prélèvement sanguin.
Lors du développement de la tumeur, certaines cellules tumorales meurent et relarguent leur contenu dans la circulation sanguine, dont leur ADN. Le contenu de cellules tumorales intactes est également relargué dans la circulation sanguine. L'origine tumorale de l'ADN circulant peut être distinguée par la présence de mutations sur des proto-oncogènes comme *KRAS* ou *TP53* [41]. Il a été mis en évidence que l'ADN tumoral retrouvé dans le plasma contenait une représentation de l'ensemble du génome de la tumeur [42].Un certain nombre de techniques sont déjà commercialisées pour permettre la détection d'ADN tumoral circulant. Différentes approches techniques ont été utilisées pour ces techniques de biologie moléculaire, toutes visant à augmenter de façon significative la sensibilité de la détection des mutations. La PCR digitale ou *digital PCR* (dPCR) permet par exemple à partir de la technique de dilutions ultimes de détecter une copie d'ADN, à partir d'un échantillon réparti dans des plaques de plusieurs milliers de puits (Roche Diagnostics, Meylan, France) [43] ou de puce (Life Technologies, Carlsbad, CA). Ainsi, l'automate est en mesure de détecter la présence ou l'absence du fragment recherché, d'où son nom de 'digitale' en rapport avec cet aspect binaire de la détection. La PCR digitale en gouttelettes ou *droplet digital PCR* (BioRad, Hercules, CA) quant à elle reprend le même principe, mais la fragmentation de l'échantillon est effectuée par émulsion dans environ 20 000 gouttelettes [44]. Ainsi, contrairement à une PCR standard, les réactions de PCR se produisent simultanément dans chaque gouttelette, permettant ainsi d'augmenter considérablement la sensibilité de la technique. Le système RainDrop (*raindance technology*, Billerica, MA) est encore une variante de la dPCR, permettant quant à elle le multiplexage et ainsi la recherche de plusieurs types de mutations au cours d'une même analyse [45]. La technique IntPlex, développée au Centre de lutte contre le cancer de Montpellier, permet également la détection de très petits fragments d'ADN circulant grâce à une technologie de PCR allèle spécifique quantitative. La spécificité et la sensibilité de la technique sont améliorées par la présence de couples d'amorces très spécifiques, ainsi que par des inhibiteurs d'amplification des fragments sauvages et la synthèse spécifique d'amplicons de faibles tailles, de l'ordre de 70 paires de bases [46]. La technique de BEAMing (Inostics, Hamburg, Allemagne) utilise quant à elle un système d'amplification à partir de microsphères aqueuses sur lesquelles sont greffées des sondes spécifiques. Une fois l'amplification effectuée, une lecture en cytométrie de flux permet d'isoler le nombre de copies d'allèles mutés [47].
Le concept de la biopsie liquide n'en sont encore qu'au stade expérimental, et pour le moment non appliqué en routine clinique, mais l'intérêt semble immense, puisque certaines études ont montré que l'ADN tumoral circulant pouvait être utilisé pour le diagnostic moléculaire, notamment dans la détermination du statut *KRAS* dans les cancers colorectaux [46], ou comme marqueur prédictif de la survie globale, comme dans les adénocarcinomes pulmonaires [48], mais également comme un moyen simple de surveillance de stabilité de la maladie, notamment dans les cancers du sein [49]. Le prochain grand défi pour les biologistes effectuant du diagnostic moléculaire tumoral sera de permettre le séquençage d'ADN tumoral circulant en routine. Des études sont déjà en cours et les résultats encourageants [50].

Conclusion

L'avènement des thérapies ciblées est un progrès incontestable pour le traitement des patients atteints de cancer. L'organisation des plateformes de génétique moléculaire a facilité la mise en place de méthodes de diagnostic moléculaire de pointe, fiables et robustes et permis de faire bénéficier les patients de la bonne molécule au bon moment. Les laboratoires pratiquant du diagnostic moléculaire peuvent aujourd'hui compter sur des tests compagnons validés et reconnus par les autorités compétentes responsables de l'accréditation des laboratoires, mais aussi sur des systèmes de diagnostic de plus en plus précis et innovants, permettant d'obtenir de plus en plus d'informations avec un matériel tumoral de plus en plus faible. De nombreux biomarqueurs sont à l'étude et le panel des biomarqueurs actuellement validés en théranostique devrait s'étoffer dans les prochaines années. Les analyses théranostiques sont aujourd'hui réservées aux laboratoires des plateformes de génétique moléculaire agréés par l'INCa, mais certains génotypages « simples » comme le génotypage

© John Libbey Eurotext, 2013

Synthèse

KRAS, *EGFR* ou *BRAF* devraient probablement devenir accessibles pour les laboratoires privés. Cependant, devant l'avancée des applications du séquençage de nouvelle génération, l'expertise des plateformes semble plus que jamais nécessaire et devrait permettre une meilleure prise en charge des patients, aussi bien pour le diagnostic de la maladie, que pour le suivi thérapeutique.

Liens d'intérêts : interventions ponctuelles : Merck Serono, Amgen, GSK, Novartis (AH, JLM) ; Roche Diagnostics (AH) ; Roche, Sanofi (JLM).

Références

1. INCa. *Dynamique d'évolution des taux de mortalité des principaux cancers en France*. Paris : INCa, 2010.

2. Bibeau F, Frugier H, Denouel A, Sabourin JC, Boissiere-Michot F. Technical considerations for KRAS testing in colorectal cancer. The pathologist's point of view. *Bull Cancer* 2009 ; 96 : 15-22.

3. Nathanson IT. Hormonal alteration of advanced cancer of the breast. *Bull New Engl Med Cent* 1948 ; 10 : 1-6.

4. Engelsman E, Persijn JP, Korsten CB, Cleton FJ. Oestrogen receptor in human breast cancer tissue and response to endocrine therapy. *Br Med J* 1973 ; 2 : 750-2.

5. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, *et al*. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001 ; 344 : 783-92.

6. Goldhirsch A, Gelber RD, Piccart-Gebhart MJ, de Azambuja E, Procter M, Suter TM, *et al*. 2 years versus 1 year of adjuvant trastuzumab for HER2-positive breast cancer (HERA) : an open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2013 ; 6736 : 61094-6.

7. Baselga J, Cortes J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, *et al*. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2012 ; 366 : 109-19.

8. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, *et al*. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA) : a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010 ; 376 : 687-97.

9. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, *et al*. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009 ; 27 : 663-71.

10. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, *et al*. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009 ; 360 : 1408-17.

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

12. Peeters M, Cohn A, Kohne CH, Douillard JY. Panitumumab in combination with cytotoxic chemotherapy for the treatment of metastatic colorectal carcinoma. *Clin Colorectal Cancer* 2012 ; 11 : 14-23.

13. Van Cutsem E, Kohne CH, Lang I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, *et al*. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer : updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 2011 ; 29 : 2011-9.

14. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, *et al*. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2013 ; 369 : 1023-34.

15. Chretien AS, Harlé A, Meyer-Lefebvre M, Rouyer M, Husson M, Ramacci C, *et al*. Optimization of routine KRAS mutation PCR-based testing procedure for rational individualized first-line-targeted therapy selection in metastatic colorectal cancer. *Cancer Medicine* 2013 ; 2 : 11-20.

16. Harle A, Busser B, Rouyer M, Harter V, Genin P, Leroux A, *et al*. Comparison of Cobas 4800 KRAS, TaqMan PCR and high resolution melting PCR assays for the detection of KRAS somatic mutations in formalin-fixed paraffin embedded colorectal carcinomas. *Virchows Arch* 2013 ; 462 : 329-35.

17. Borras E, Jurado I, Hernan I, Gamundi MJ, Dias M, Marti I, *et al*. Clinical pharmacogenomic testing of KRAS, BRAF and EGFR mutations by high resolution melting analysis and ultra-deep pyrosequencing. *BMC Cancer* 2011 ; 11 : 1471-2407.

18. Blons H, Laurent-Puig P. Technical considerations for KRAS testing in colorectal cancer. The biologist's point of view. *Bull Cancer* 2009 ; 96 : S47-56.

19. Netzel BC, Grebe SK. Companion-diagnostic testing limited to KRAS codons 12 and 13 misses 17% of potentially relevant RAS mutations in colorectal cancer. *Clin Chim Acta* 2013 ; july 4 : epub ahead of print.

20. INCa. *Programme INCa pour la détection prospective des biomarqueurs émergents dans le cancer du poumon, le cancer colorectal et le mélanome : une nouvelle approche pour un accès rapide aux thérapies ciblées*. Paris : INCa, 2010.

21. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, *et al*. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009 ; 361 : 947-57.

22. Shepherd FA, Bunn PA, Paz-Ares L. Lung cancer in 2013. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2013 ; 2013 : 339-46.

23. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, *et al*. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2011 ; 363 : 1693-703.

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

25. Marin C, Beauchet A, Capper D, Zimmermann U, Julie C, Ilie M, *et al*. Detection of BRAF p.V600E mutations in melanoma by immunohistochemistry has a good interobserver reproducibility. *Arch Pathol Lab Med* 2013 ; 2013 : 7.

26. Emile JF. Gastrointestinal stromal tumors (GIST) : at the forefront of targeted therapies. *Med Sci* 2013 ; 29 : 630-6.

27. Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, *et al*. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003 ; 21 : 4342-9.

28. Cassier PA, Fumagalli E, Rutkowski P, Schoffski P, Van Glabbeke M, Debiec-Rychter M, *et al*. Outcome of patients with platelet-derived growth factor receptor alpha-mutated gastrointestinal stromal tumors in the tyrosine kinase inhibitor era. *Clin Cancer Res* 2012 ; 18 : 4458-64.

© John Libbey Eurotext, 2013

Tirés à part strictement réservés

29. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 1960 ; 25 : 85-109.

30. Rowley JD. Letter : a new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973 ; 243 : 290-3.

31. Cohen MH, Williams G, Johnson JR, Duan J, Gobburu J, Rahman A, *et al*. Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 2002 ; 8 : 935-42.

32. Mark HF, Sokolic RA, Mark Y. Conventional cytogenetics and FISH in the detection of BCR/ABL fusion in chronic myeloid leukemia (CML). *Exp Mol Pathol* 2006 ; 81 : 1-7.

33. Foroni L, Gerrard G, Nna E, Khorashad JS, Stevens D, Swale B, *et al*. Technical aspects and clinical applications of measuring BCR-ABL1 transcripts number in chronic myeloid leukemia. *Am J Hematol* 2009 ; 84 : 517-22.

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

35. Harle A, Lion M, Lozano N, Husson M, Harter V, Genin P, *et al*. Analysis of PIK3CA exon 9 and 20 mutations in breast cancers using PCR-HRM and PCR-ARMS : correlation with clinicopathological criteria. *Oncol Rep* 2013 ; 29 : 1043-52.

36. Razis E, Bobos M, Kotoula V, Eleftheraki AG, Kalofonos HP, Pavlakis K, *et al*. Evaluation of the association of PIK3CA mutations and PTEN loss with efficacy of trastuzumab therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011 ; 128 : 447-56.

37. Dave B, Migliaccio I, Gutierrez MC, Wu MF, Chamness GC, Wong H, *et al*. Loss of phosphatase and tensin homolog or phosphoinositol-3 kinase activation and response to trastuzumab or lapatinib in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing locally advanced breast cancers. *J Clin Oncol* 2011 ; 29 : 166-73.

38. Sosman JA, Daud A, Weber JS, Kim K, Kefford R, Flaherty KI, *et al*. BRAF inhibitor (BRAFi) dabrafenib in combination with the MEK1/2 inhibitor (MEKi) trametinib in BRAFi-naive and BRAFi-resistant patients (pts) with BRAF mutation-positive metastatic melanoma (MM). *J Clin Oncol* 2013 ; 31 : 9005.

39. Peeters M, Oliner KS, Parker A, Siena S, Van Cutsem E, Huang J, *et al*. Massively parallel tumor multigene sequencing to evaluate response to panitumumab in a randomized phase III study of metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2013 ; 19 : 1902-12.

40. Singh RR, Patel KP, Routbort MJ, Reddy NG, Barkoh BA, Handal B, *et al*. Clinical validation of a next-generation sequencing screen for mutational hotspots in 46 cancer-related genes. *J Mol Diagn* 2013 ; 15 : 607-22.

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

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

43. Pohl G, Shih Ie M. Principle and applications of digital PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2004 ; 4 : 41-7.

44. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, *et al*. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* 2011 ; 83 : 8604-10.

45. Zhong Q, Bhattacharya S, Kotsopoulos S, Olson J, Taly V, Griffiths AD, *et al*. Multiplex digital PCR : breaking the one target per color barrier of quantitative PCR. *Lab Chip* 2011 ; 11 : 2167-74.

46. Mouliere F, El Messaoudi S, Gongora C, Guedj AS, Robert B, Del Rio M, *et al*. Circulating cell-free DNA from colorectal cancer patients may reveal high KRAS or BRAF mutation load. *Transl Oncol* 2013 ; 6 : 319-28.

47. Diehl F, Li M, He Y, Kinzler KW, Vogelstein B, Dressman D. BEAMing : single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat Methods* 2006 ; 3 : 551-9.

48. Catarino R, Coelho A, Araujo A, Gomes M, Nogueira A, Lopes C, *et al*. Circulating DNA : diagnostic tool and predictive marker for overall survival of NSCLC patients. *PLoS One* 2012 ; 7 : 12.

49. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, *et al*. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013 ; 368 : 1199-209.

50. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, *et al*. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 2013 ; 497 : 108-12.

Tiré à part de l'auteur

© John Libbey Eurotext, 2013

II.2. Optimisation des tests de PCR de routine pour le génotypage du gène *KRAS* pour une prescription rationnelle et individualisée des thérapies ciblées en première ligne dans les cancers colorectaux métastatiques

La recherche des mutations des codons 12 et 13 de *KRAS* a été rendue obligatoire par l'EMA (European Medicines Agency) avant toute prescription d'un anti-EGFR dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques, suite aux publications démontrant le caractère prédictif de résistance de ces mutations (7, 34, 35). L'un des enjeux principaux des plateformes de génétique moléculaire est de trouver la technique la plus fiable possible, c'est à dire permettant de manière sensible et spécifique la détermination du génotype de *KRAS*. En effet, une mauvaise sensibilité analytique peut avoir des impacts pour les patients, notamment lorsque la fréquence des mutations se révèle être inférieure à cette sensibilité. Pour les patients présentant un faible taux de gènes mutés, il a été démontré que le cetuximab ne présentait aucun intérêt (122). À ces contraintes techniques se rajoutent les contraintes organisationnelles pour les cliniciens. En effet, la détermination du statut de *KRAS* doit se réaliser dans un temps compatible avec la pratique clinique, c'est à dire avec un délai compatible avec l'organisation des soins. C'est dans un sens qu'un article original présentant l'organisation et les techniques les mieux adaptées pour la routine, prenant en compte les contraintes citées précédemment, a été publié dans Cancer Medicine en 2013 (Chretien A.S., Harlé A., Meyer-Lefebvre M., Rouyer M., Husson M., Ramacci C., Leroux A., Genin P., Merlin J.L. Optimization of routine KRAS mutation testing procedure for rational individualized first line targeted therapy selection in metastatic colorectal cancer. *Cancer Medicine. 2013 Feb, Vol. 2(1):11-20*)

Introduction

La détection des mutations de *KRAS* est une étape importante dans la prise en charge des patients atteints de cancers colorectaux métastatiques. L'optimisation des délais du génotypage de *KRAS* pour une prescription rationnelle des thérapies ciblées anti-EGFR nécessite des techniques de biologie moléculaire rapides et robustes.

Matériel & Méthode

Nous avons analysé en routine 674 échantillons de tumeurs fixées au formol et incluses en paraffine, prélevées chez des patients atteints de cancers colorectaux métastatiques et analysé les codons 12 et 13 du gène *KRAS* en utilisant trois techniques de biologie moléculaire : La PCR HRM (High Resolution Melting), la RFLP (Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism) et la PCR TaqMan (PCR par discrimination allélique).

Résultats

Sur les 674 échantillons analysés, 1,5% (10/674) n'ont pas pu être analysés car l'ADN était trop dégradé. Parmi les échantillons interprétables, une mutation du gène *KRAS* a été détectée dans 38,0% des échantillons analysés (256/674) (82,4% sur le codon 12 et 17,6% sur le codon 13). Sur les 613 échantillons pour lesquels les trois techniques ont pu être effectuées, 12 cas discordants (2,0%) ont été rapportés. La RFLP est responsable de 10 cas discordants sur 12 (83,3%). Ces résultats ont été confirmés par analyse via une quatrième technique effectuée de manière rétrospective (Cobas 4800). Les trois techniques étaient statistiquement comparables ($\kappa > 0,9$, $p < 0,001$).

Conclusion

L'utilisation en routine de la PCR HRM et de la PCR TaqMan, puis de la RFLP en cas de discordance, permet d'optimiser considérablement les délais. Les résultats ont montré une très bonne corrélation

entre les trois techniques. L'utilisation de la PCR HRM et de la PCR TaqMan garantie des résultats de qualité pour la détection des mutations présentes sur les codons 12 et 13 du gène *KRAS* sur des prélèvements fixés au formol et inclus en paraffine. La nouvelle procédure a permis de réduire de manière considérable la durée de rendu des résultats, permettant la prescription des thérapies ciblées de façon rationnelle dans la première ligne de traitement des cancers colorectaux métastatiques.

Cancer Medicine

Open Access

ORIGINAL RESEARCH

Optimization of routine *KRAS* mutation PCR-based testing procedure for rational individualized first-line-targeted therapy selection in metastatic colorectal cancer

Anne-Sophie Chretien[1,2,3], Alexandre Harlé[1,2,3], Magali Meyer-Lefebvre[1], Marie Rouyer[1], Marie Husson[1], Carole Ramacci[1], Valentin Harter[4], Pascal Genin[1], Agnès Leroux[1,2,3] & Jean-Louis Merlin[1,2,3]

[1]Service de Biopathologie, Centre Alexis Vautrin, 6 Avenue de Bourgogne, 54519, Vandœuvre-lès-Nancy, France
[2]CNRS, UMR 7039 CRAN, Nancy, France
[3]Université de Lorraine, Nancy, France
[4]Service de Biostatistiques, Centre Alexis Vautrin, 6 Avenue de Bourgogne, 54519, Vandœuvre-lès-Nancy, France

Keywords
Colorectal cancer, HRM, *KRAS*, PCR-RFLP, TaqMan PCR

Correspondence
Alexandre Harlé, Unité de Biologie des Tumeurs, Centre Alexis Vautrin, 6 Avenue de Bourgogne CS 30519, 54519 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France. Tel: +33 383 59 86 73; Fax: +33 383 59 85 69; E-mail: a.harle@nancy.unicancer.fr

Funding Information
No funding information provided.

Received: 1 August 2012; Revised: 26 October 2012; Accepted: 31 October 2012

doi: 10.1002/cam4.47

Abstract

KRAS mutation detection represents a crucial issue in metastatic colorectal cancer (mCRC). The optimization of *KRAS* mutation detection delay enabling rational prescription of first-line treatment in mCRC including anti-EGFR-targeted therapy requires robust and rapid molecular biology techniques. Routine analysis of mutations in codons 12 and 13 on 674 paraffin-embedded tissue specimens of mCRC has been performed for *KRAS* mutations detection using three molecular biology techniques, that is, high-resolution melting (HRM), polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), and allelic discrimination PCR (TaqMan PCR). Discordant cases were assessed with COBAS 4800 *KRAS* CE-IVD assay. Among the 674 tumor specimens, 1.5% (10/674) had excessive DNA degradation and could not be analyzed. *KRAS* mutations were detected in 38.0% (256/674) of the analysable specimens (82.4% in codon 12 and 17.6% in codon 13). Among 613 specimens in whom all three techniques were used, 12 (2.0%) cases of discordance between the three techniques were observed. 83.3% (10/12) of the discordances were due to PCR-RFLP as confirmed by COBAS 4800 retrospective analysis. The three techniques were statistically comparable ($\kappa > 0.9$; $P < 0.001$). From these results, optimization of the routine procedure consisted of proceeding to systematic *KRAS* detection using HRM and TaqMan and PCR-RFLP in case of discordance and allowed significant decrease in delays. The results showed an excellent correlation between the three techniques. Using HRM and TaqMan warrants high-quality and rapid-routine *KRAS* mutation detection in paraffin-embedded tumor specimens. The new procedure allowed a significant decrease in delays for reporting results, enabling rational prescription of first-line-targeted therapy in mCRC.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the second most common cause of cancer with more than one million new cases diagnosed every year [1]. The World Health Organization estimates that 608,000 people die every year from clinical complications and metastasis of CRC.

From 2006 to 2008, several studies showed the importance of the *KRAS* oncogene in the treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC) and response to anti-EGFR therapies as cetuximab or panitumumab [2–6]. KRAS is a small G protein, which can bear activating mutations in 40% cases of mCRC [7]. *KRAS* mutations cause RAS protein accumulation in an active state through intrinsic GTPase activity inhibition, which leads to the constitutive activation of the RAS/RAF/MAPK signaling pathway [8]. The most common reported mutations of *KRAS* are on codon 12 (c.35G>A – p.G12D; c.35G>T – p.G12V; c.34G>T – p.G12C; c.34G>A – p.G12S; c.35G>C – p.G12A, and c.34G>C – p.G12R) and codon 13 (c.38G>A – p.G13D)

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

and represent 98.2% of the mutations located in the exon 2 [9]. G13D mutations represent more than 87% of codon 13 mutations according to COSMIC Sanger database. Mutations on codons 61 and 146 have also been described in 2.1% and 1.9% of the cases, respectively [7]. Only one retrospective study showed the impact of codon 61 or codon 146 on response to anti-EGFR therapies in mCRC [10] and only codons 12 and 13 mutations are clearly reported to be predictive of response to cetuximab or panitumumab. *KRAS* mutation detection on codons 12 and 13 is mandatory for the administration of anti-EGFR therapies, as the OPUS [11] and CRYSTAL [12] studies showed that *KRAS* mutations are predictive of response to treatment to cetuximab associated with fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX) or fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI), respectively. A pooled analysis of both studies showed that addition of cetuximab in wild-type *KRAS* patients with mCRC improves progression-free survival and overall survival [13]. Benefits of panitumumab associated with FOLFOX or FOLFIRI have been described on progression free survival (PFS) in wild-type *KRAS* patients with mCRC [14–16] in first-line treatment, but the OS was only significantly better when associated with FOLFIRI [14]. In second-line treatment, PFS was significantly better when FOLFIRI was associated with panitumumab [17]. Although the EGFR signaling pathway is thought to play a central role in cell proliferation and malignant transformation, no correlation has been shown between EGFR expression and response to treatment. Furthermore, *EGFR* mutations are rare (<1%) in colorectal cancer [18] and had no influence on anti-EGFR response in mCRC and therefore cannot be used to predict the clinical response to anti-EGFR monoclonal antibodies.

The introduction of targeted therapies, that is, anti-VEGF and anti-EGFR monoclonal antibodies, have substantially enriched the therapeutic options in mCRC, and long-term survival (>48 months) can now be achieved in approximately one-third of the patients [19]. In addition, improvement of the rate of resectability of metastases after conversion chemotherapy results in cure for numerous patients [20]. Therefore, the selection of first-line therapy in mCRC is crucial and must be individualized according to the treatment strategy, the patient tumor biology, and the toxicity associated with each therapeutic option. The health authorities regulatory restriction of the prescription of anti-EGFR monoclonal antibodies to wild-type *KRAS* tumor patients plays a major role in selecting anti-VEGF or anti-EGFR introduction in first-line therapy. No present molecular diagnostic has been required or identified for the prescription of the anti-VEGF monoclonal antibody bevacizumab.

Based on this knowledge, routine *KRAS* mutation detection plays a major role in the choice between first-line therapies using anti-EGFR or anti-VEGF monoclonal antibodies: the oncologists need to choose in a rational way the first-line therapy, that is, with all decision-making data being available and not by default because *KRAS* mutation detection results are not available at the time of initiation of the first-line therapy.

There is no standardized method for *KRAS* mutation testing. Sequencing is considered the "gold standard," but has been reported to suffer from a lack of specificity and sensitivity, justifying extensive evaluation of alternative techniques for routine *KRAS* detection analysis. Recently, the use of sequencing was showed to yield misinterpretation leading to lack of response to anti-EGFR antibodies in mCRC bearing small *KRAS*-mutated DNA content [21, 22]. Recent paper by Molinari et al. [23] showed that direct sequencing has a sensitivity of 20%, and this sensitivity can be better using techniques like MALDI-TOF MS, mutant-enriched PCR, or engineered mutant-enriched PCR to 10%, 0.1%, and 0.1%, respectively.

The aim of this study conducted in Alexis Vautrin Cancer Center was to establish a rapid, robust, and sensitive *KRAS* mutations determination testing procedure in order to provide reliable results to the oncologists with shortest delay, contributing to the best care provided to the patients. Some hypotheses regarding the quality on the tumor tissue specimens are also discussed. Thus, we compared high-resolution melting (HRM) analysis, polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), and TaqMan PCR techniques for determination of *KRAS* mutations, then we compared our data with the literature, and we finally evaluated the impact of the techniques on the delay between analysis prescription by the oncologist and the result reporting.

Material and Methods

Study population

A total of 674 paraffin-embedded biopsies and resection specimens from patients with a metastatic colorectal cancer have been collected from academic and private pathology laboratories for routine *KRAS* status assessment in the Alexis Vautrin Cancer Center from January 2008 to December 2009. Of the 674 samples, 582 were from colorectal primitive tumors (86.4%) and 83 from metastatic sites (12.3%). This information was not available for nine samples (1.3%). The sex ratio M/F was 1.51 and the median age was 65.1 years with a range of 24–87.

DNA extraction

Tumor specimens were macrodissected after hematoxylin–eosin slide qualification by a pathologist to ensure a

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

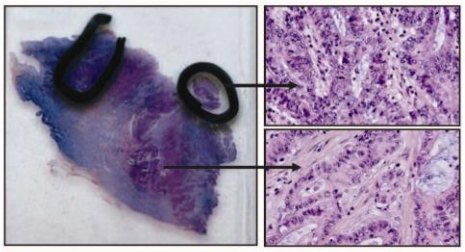


Figure 1. Macrodissection step to ensure a minimum of 20% tumor tissue content. The hematoxylin–eosin slide with selected area contains more than 20% tumor cells.

minimum of 20% tumor tissue content as recommended by Bibeau et al. (Fig. 1) [24]. Five 10-μm-thick serial sections were cut from each paraffin block and collected in Eppendorf® vials. DNA isolation was performed using the QIAamp DNA FFPE tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) protocol. Briefly, paraffin was removed by extraction with toluene and centrifuged. The pellet was then washed with ethanol, centrifuged, and resuspended with 180 μL of tissue lysis buffer (buffer ATL; Qiagen) and 20 μL of proteinase K. The sample was gently mixed, incubated at 56°C for 1 h and 90°C for 1 h under agitation. DNA was extracted with MinElute Columns (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. The nucleic acids were eluted in a volume of 100 μL and diluted to have a final concentration of 20 ng/μL. DNA with identified *KRAS* mutations were used as positive control and known wild-type DNA as negative control.

TaqMan PCR

The presence of the seven most common *KRAS* mutations in mCRC (codon 12: G12D, G12V, G12C, G12S, G12A, G12R; codon 13: G13D) was determined by TaqMan allelic discrimination assay according to Lievre et al. [4]. Specific probes for each allele (mutated and nonmutated alleles) were labeled, respectively, with the fluorescence reporter dyes FAM and VIC at their 5′-end. Reactions were performed in 5 μL comprising 20 ng of DNA using 384-well plates (Roche Diagnostics, Meylan, France), specific primers and probes, and TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, Villebon-sur-yvette, France). DNA was then submitted to the following cycle conditions: 95°C for 10 min; 40 cycles, 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. Data were analyzed with LC480 software (Roche Diagnostics). All assays were performed in duplicate.

High-resolution melting analysis

HRM analysis was performed using the LC 480 HRM Master kit (Roche Diagnostics) and 384-well plates (Roche Diagnostics, Hamburg, Germany) according to Krypuy et al. [25]. HRM analysis allows to detect all the possible somatic mutations of exon 2 including all codons 12 and 13 mutations. Forty nanograms of DNA was amplified in a final volume of 18 μL by using the following: 10 μL of Master Mix HRM LC480, 2 μL of $MgCl_2$ (25 mmol/L), 1 μL of primers (4 μmol/L) (Eurogentec, Seraing, Belgium), 2 μL of water. DNA was then submitted to the following cycle conditions: initial denaturation at 95°C for 10 min followed by 45 cycles of 10 sec at 95°C, 15 sec at 67°C, and 10 sec at 72°C. For the HRM melting profile, samples were denatured with an initial hold of 1 min at 95°C and 1 min at 40°C and a melting profile from 65°C to 95°C with a ramping degree of 0.02°C/sec. All assays were performed in duplicate.

PCR-RFLP

A two-step PCR-RFLP was performed according to Schimanski [26] as previously described [27]. Briefly, 100-ng DNA was used as template for the first PCR (Master Cycler Gradient, Eppendorf, Germany) with the oligonucleotide primers Ras A (sense; 5′-ACTGAATATAAA CTTGTGGTCCATGGAGCT-3′) and Ras B (antisense; 5′-TTATCTGTATCAAAGAATGGTCCTGCACCA-3′). PCR products were then submitted to enzymatic digestion with either BstXI or XcmI, restricting the amplicon if the first two bases of codon 12 (BstXI) and codon 13 (XcmI) was wild type. The first digest (2 μL) was used as template for the second PCR in which primer Ras C (antisense; 5′-GGATGGTCCTCCACC AGTAATATGGATATTA-3′) was used instead of Ras B. Second PCR product (7 μL) was digested with either BstXI or XcmI. The digest product (10 μL) was submitted to 4% agarose gel stained with ethidium bromide and analyzed under UV light (GelDoc EQ; Bio-Rad, Hercules, CA). All assesses were processed in a controlled atmosphere room to avoid samples cross-contaminations.

COBAS 4800 *KRAS*

Discordant cases were retrospectively re-analyzed using the CE-IVD-validated COBAS 4800 *KRAS* TaqMelt assay (Roche Diagnostics). Samples were processed according to the manufacturer's protocol based on previously validated data [28]. Fifty nanograms of previously extracted DNA was dispatched in 96-well plates (Roche Diagnostics), as well as negative and positive controls from the kit. Mutations detection is achieved automatically by the COBAS software achieving melting curves analysis. Amplification detection, quality control analysis, and result interpretation are automated using software package. All samples were processed once, as recommended by the manufacturer.

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

Sensitivity

The sensitivity of RFLP, PCR-HRM, and PCR TaqMan assays was evaluated by mixing codon 12 mutated and wild-type DNA from cell lines (A549 as codon 12 mutated, WIDR as wild type) at 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2.5% and 1% ratios. Same protocol has been followed for the determination of the sensitivity for codon 13 mutations (LOVO as codon 13 mutated, WIDR as wild type).

Statistics

Significance of the concordance of mutation detection with different methods was assessed by κ statistics. κ superior to 0.8 was considered statistically significant. The chi-square test was used to compare mutation frequencies within data or with those obtained from literature. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

KRAS somatic mutation detection was assessed for routine diagnostic in a blinded fashion on the 674 samples using TaqMan PCR, HRM PCR, and PCR-RFLP assays (Fig. 2). PCR-RFLP provided 32 (4.7%) of noninterpretable (NI) results, 22 (3.3%) for TaqMan PCR, and 37 (5.5%) for HRM PCR (Table 1). Among the 674 tumor specimens, 1.5% (10/674) remained NI, even combining the results of the three techniques, because of excessive DNA degradation.

Among the 652 interpretable cases, TaqMan PCR revealed 256 cases (39.3%) with mutation in either codon 12 (82.4%) or codon 13 (17.6%) (Fig. 3). Mutations were distributed as follows: 101 G12D mutations (39.4%), 62 G12V mutations G12V (24.2%), 19 G12C mutations (7.4%), 12 G12A mutations (4.7%), 14 G12S mutations (5.5%), 3 G12R mutations (1.2%), and 45 G13D mutations (17.6%). Among the 637 interpretable cases, HRM PCR revealed 254 *KRAS* mutations (39.9%) (Fig. 3). PCR-RFLP revealed 250 of 642 interpretable cases (38.9%) with *KRAS* mutations, among which 206/250 (82.4%) were located in codon 12 and 44/250 (17.6%) in codon 13 (Fig. 3). Overall, as well as for each technique, all mutations frequencies were compared with data extracted from the Sanger Cosmic data base (http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/) and were found to be fully consistent with the reference frequencies (chi-square test nonsignificant for all the data). A comparison of mutations frequencies between resections and biopsies revealed no significant difference, as already evidenced by Weichert et al. (chi-square test data not showed) [29].

A comparison of these three methods yielded κ values exceeding 0.9 ($P < 0.001$), showing an excellent correlation between the three techniques used (Table 2). Among 613 specimens in whom all three techniques were used and gave interpretable results, 12 (2.0%) cases of discordance between the three techniques were observed. In these discordant cases, the complete procedure (from DNA extraction to PCR) was systematically repeated. Discordant samples were processed retrospectively using COBAS 4800 *KRAS* CE-IVD validated method. Mutated samples, detected as nonmutated samples, were considered false negative. Nonmutated samples, detected as mutated samples, were considered false positive. More than 83% (10/12) of discordances were attributable to PCR-RFLP, as revealed by a second analysis of the same sample. Six false-positive samples and four false-negative samples were found. No false positive were found with TaqMan PCR and HRM PCR. Two false negative were found with TaqMan PCR (detected with RFLP, HRM, and COBAS) and two false negative were found with HRM PCR (detected with TaqMan and COBAS) (Table 1).

Optimization of the routine procedure consisted of proceeding to systematic *KRAS* detection using HRM and TaqMan PCR instead of simultaneous use of HRM, TaqMan PCR, and PCR-RFLP. The use of PCR-RFLP was restricted to discordant cases. This new operating procedure allowed to significantly reduce the reporting delay on the basis of weekly analyzes from 10.5 ± 7.0 days to 8.5 ± 3.3 days ($P < 0.001$), that is, a 19% decrease.

DNA quality

Ten samples provided NI results. Among the NI results, 70% of the tumor samples results were provided by 5% of pathology laboratories, probably related to preanalytical procedure (paraffin embedding, fixative, and fixation time) that could be responsive for DNA degradation. Among discordant results, 30% are provided by these 5% laboratories. This may suggest that the preanalytical step could be responsive for increased false-positive or false-negative patients. However, no significant difference was found when comparing the frequency of *KRAS* mutations in different pathology laboratories (data not shown).

Sensitivity

Samples have been processed with the four assays and compared (Table 3). For RFLP and HRM, limits of sensitivity were 5% of mutated DNA for codon 12. For COBAS, limits of sensitivity were less than 1% of mutated DNA. PCR TaqMan sensitivity was better for G12D, G12V, and G12C (<1% of mutated DNA), G12A (2.5% of mutated DNA), and equal to other assays for G12S and G12R mutations (5% of mutated DNA). Limits of

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

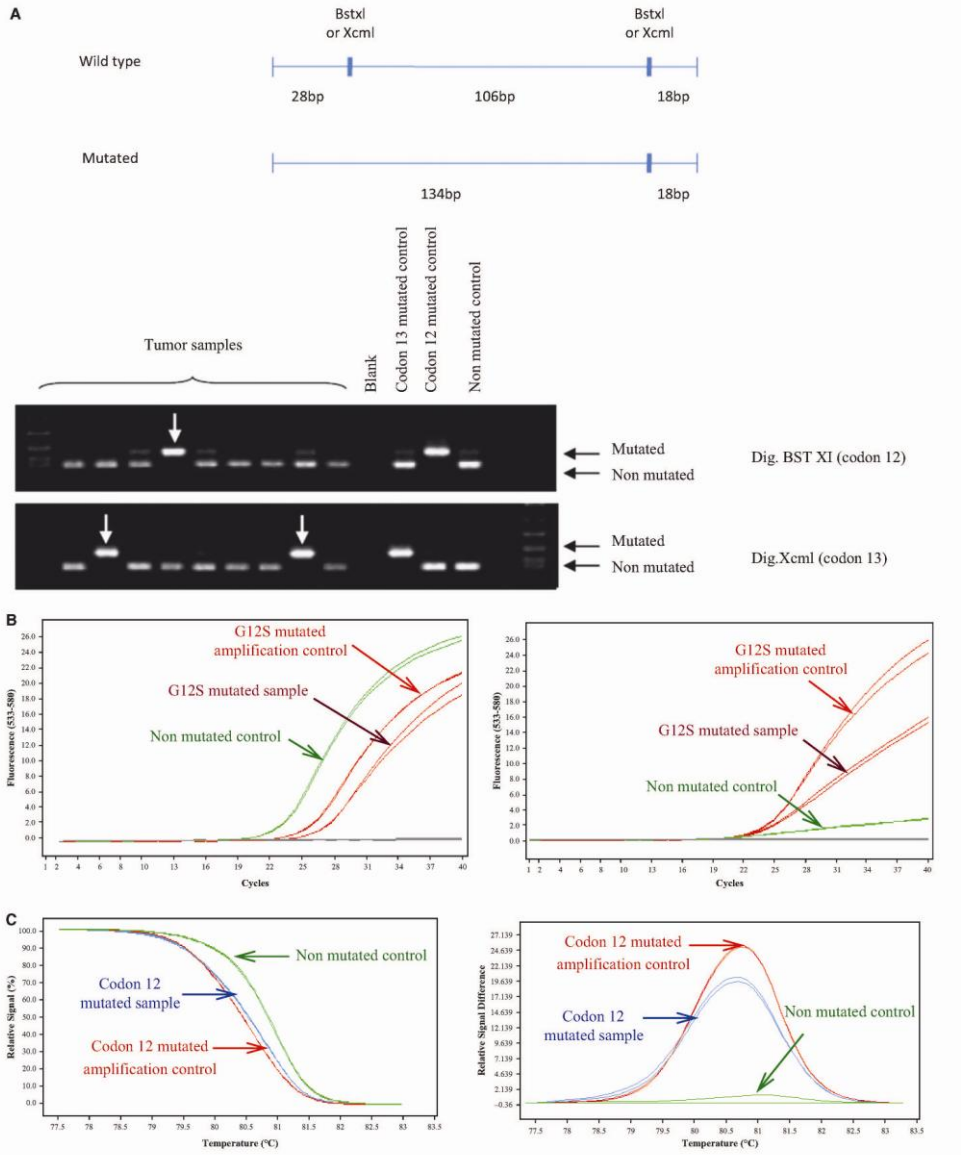


Figure 2. (A) *KRAS* mutation analysis using PCR-RFLP. DNA extracts from tumor samples were submitted to double PCR amplification after BstXI and XcmI enzymatic digestion allowing discrimination of codons 12 and 13 mutations. Codons 12 and 13 mutated DNA were used as positive control. Wild-type *KRAS* DNA and water were used as negative controls. (B) Example of codon 12 *KRAS* mutation detection using TaqMan PCR. Left panel represents amplification control (VIC). Right panel represents G12S mutation detection (FAM). (C) Example of codon 12 *KRAS* mutation detection using HRM. Depending on the presence or the absence of mutation, the melting temperature is different (left panel). The plot of the relative signal difference against the temperature allows to evidence the presence or the absence of *KRAS* mutation (right panel).

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

Table 1. Interpretable, noninterpretable (NI) results and discordances for polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), TaqMan PCR, and HRM PCR. TaqMan PCR showed less NI results than the two other assays.

n = 674	PCR-RFLP		TaqMan PCR		HRM PCR	
Interpretable	640	(94.96%)	650	(96.44%)	635	(94.21%)
NI	32	(4.75%)	22	(3.26%)	37	(5.49%)
False positive	4	(0.62%)	0	(0.00%)	0	(0.00%)
False negative	6	(0.93%)	2	(0.31%)	2	(0.31%)

sensitivity for codon 13 were 5% of mutated DNA for RFLP, HRM, 2.5% of mutated DNA for TaqMan PCR, and less than 1% of mutated DNA for COBAS.

Discussion

Determination of *KRAS* status before prescription of anti-EGFR therapy is mandatory for patients with metastatic colorectal carcinoma (mCRC). The rational selection of the first-line individualized therapy, between anti-EGFR therapy and anti-VEGF therapy, is only possible if the patient benefits of tumor *KRAS* mutation testing, whereas without this determination, the therapeutic choice would be done by default. This improvement of the personalized medicine implicates that the oncologist should be provided with reliable results within delay that is consistent with the clinical management of the patient. Therefore, the optimization of *KRAS* mutations analysis for prescription of cetuximab and panitumumab in mCRC needs rapid and robust molecular biology techniques. However, validated methods and standardized testing procedures are lacking. Here, we report a comparison between three methods for *KRAS* mutation testing: HRM PCR, TaqMan PCR, and PCR-RFLP. These methods are found to be equivalent; however, HRM seems to be accurate enough as already shown by Weichert et al. [29] and represents a fast method for scanning somatic sequence alterations [30]. HRM PCR sensitivity is close to 100% [30–32], but as showed by the two false-negative results found in this study, this assay should be coupled with a more sensitive technique. The identification of the mutations located in codons 12 and 13, for example, 90% of *KRAS* mutations [33] in accordance with European *KRAS* Quality Assurance Program [34], is also a point to focus, according to recent studies suggesting that patients with *KRAS* G13D-mutated tumors could benefits of cetuximab therapy [35, 36]. Thus, the use of Taqman PCR allows mutations

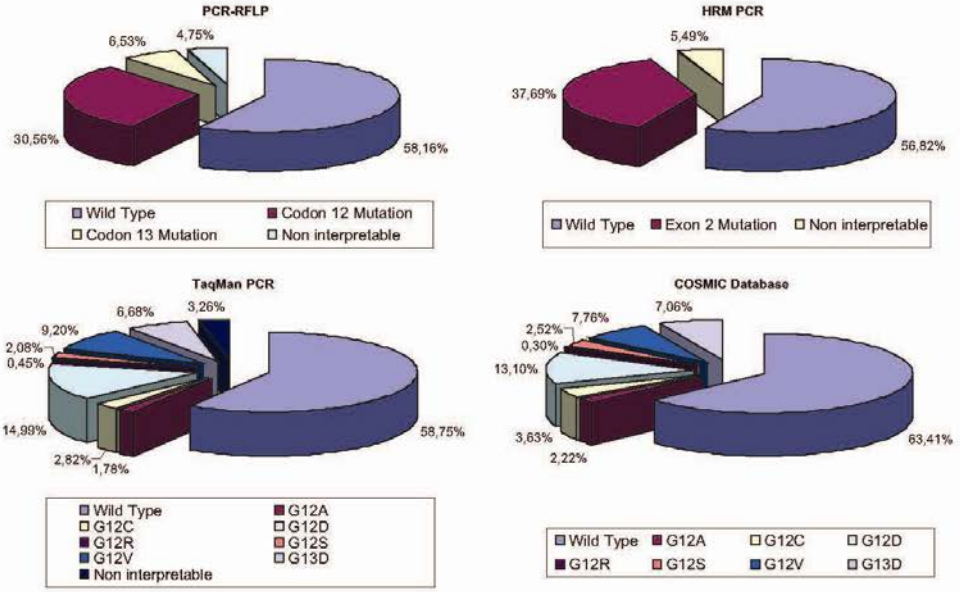


Figure 3. Comparison of mutation frequency as determined by the different detection methods. Overall as well as for each technique, all mutations frequencies were compared with average data from the Sanger Cosmic data base and were found to be fully consistent with the theoretical frequencies (chi-square test nonsignificant for all the data).

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

Table 2. Crossover comparison of mutation frequency as determined by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), PCR Taqman, and HRM PCR: κ values exceed 0.9 ($P < 0.001$), showing an excellent correlation between the three techniques.

	PCR-RFLP	HRM PCR
TaqMan PCR	$n = 631$ $\kappa = 0.960$ $P < 0.001$	$n = 630$ $\kappa = 0.987$ $P < 0.001$
HRM PCR	$n = 619$ $\kappa = 0.973$ $P < 0.001$	

Table 3. Sensitivity of RFLP, PCR TaqMan, HRM, and COBAS assays. The sensitivity was evaluated by mixing codon 12 or codon 13 mutated and wild-type DNA from cell lines at 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2.5%, and 1% ratios.

	Codon 12						Codon 13
	G12D	G12V	G12C	G12S	G12A	G12R	G13D
RFLP			2.5%				5.0%
TaqMan PCR	<1.0%	<1.0%	<1.0%	5.0%	2.5%	5.0%	2.5%
HRM PCR			5.0%				5.0%
COBAS			<1.0%				<1.0%

identification and is reliable and sensitive [4, 37, 38]. In our study, two false negative were detected when compared with other technique which confirm that this technique should be systematically coupled with a non-specific PCR method as HRM or TaqMelt.

Mutations located in codons 61 and 146 are less frequent and their detection is not mandatory before anti-EGFR antibodies prescription, although prevalence of these mutations is higher than some of the mutations in codon 12 [7, 39, 40]. As functional consequences on RAS protein could be different of codons 12 and 13 mutations, the clinical implication of these mutations remained unclear until recently [6, 18]. However, recent studies emphasize the negative impact of these mutations on the response rate to anti-EGFR monoclonal antibodies [10, 39] and might highlight the need for simultaneous detection of mutations in codons 12, 13, 61, and 146 using, for example, multiplex amplification of exons 2, 3, and 4, as proposed by several authors [41, 42].

In our institute, the new procedure consisting in using HRM and TaqMan PCR in all specimens and to restrict the use of PCR-RFLP to discordant cases was found to significantly reduce the delay of result reporting, but also to improve the accuracy. Combining three mutation testing techniques greatly reduces the probability to get false-negative or false-positive result. The alternative approach consisting in systematically repeating the whole procedure [43] (e.g. confirmation of *KRAS* mutations by two independent analyses) would lead to increases of the reporting delay, consuming of tumor sample, and would probably not overcome the lack of sensitivity or specificity of a single method. The recent Flash-*KRAS* study [44] showed that the mean delay in France for *KRAS* genotyping was 23.6 ± 28.2 days in 2011. This study showed the importance of the choice of an appropriate assay to provide *KRAS* genotyping results in the recommended 2–3 weeks of delay of the French National Cancer Institute (INCa).

This study also emphasized that the preanalytical procedure needs to be strictly controlled as DNA degradation was found to be the main cause of NI results, thus leading to late reporting of the results, as well as an overcost when repeating the analysis. Moreover, these samples are also unusable for other genetic tests. Bouin fixation is a well-known cause of DNA degradation, leading to NI results in almost 100% of the cases. Fixation duration has been shown to be a critical parameter as well: Inoue et al. [45] demonstrated that if the samples are fixed in 10% nonbuffered formalin for 1 day, 100% of samples show successful PCR, while only 44% of samples show successful PCR when fixed for 2–3 days. More recent studies also showed the influence of the fixative choice, the paraffin temperature, and warm and cold ischemia on the DNA quality for molecular biology [46, 47]. In addition, several recent studies reported that paraffin embedding and fixation procedures may induce nucleotide changes through deamination of cytosine and adenine. These deaminations generate uracil and hypoxanthine, respectively, and lead to artifactual C>T and G>A transitions and provide false-positive results [48, 49]. This can partly explain discordances observed in our study. Indeed, Marchetti et al. described [50] repeated 10 PCR amplifications on clinical samples. For a same sample, the presence or the absence of uracil could lead to artifactual mutations only in some of the PCR products, thus leading to a false-positive result. Beside this phenomenon, discordances can also be explained by the difference of sensitivity and specificity of the different methods.

Therefore, the preanalytical steps should be optimized and controlled in order to warrant the quality of nucleic acids.

Beside fixation, the step of macrodissection has been reported to be highly critical [48]. According to the authors, the detection rates of mutations clearly decreased with the percentage of tumor cells, and the limit of 20% of tumor material seems to be critical, with a dramatic increase in the risk of false-negative results. In our study, all samples were macrodissected in order to ensure a min-

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

imum of 20% of tumor material, and the percentages of each mutations were found to be fully consistent with literature data [51].

Following the question of samples with low cellularity (particularly in the case of neoadjuvant treatment), some authors recommend that a biopsy should be always dedicated to molecular biology before treatment, or to replace the step of macrodissection by laser microdissection [48].

In case of NI results with all assays, a new sample originating from a different tumor site is requested if available.

To conclude, this study emphasizes the fact that *KRAS* mutations analysis in mCRC needs quality control procedures from preanalytical to analytical steps. Our experience using HRM and TaqMan PCR in routine shows that reporting delays suitable with the oncologist expectation could be achieved and enable rational, fully documented, selection of first-line therapy in mCRC. However, with only approximately 50% of the patients responding to anti-EGFR monoclonal antibodies, it should be kept in mind that *KRAS* status has a poor positive predictive value [52]. This emphasizes the need for additional response predictive markers to improve the selection of potential responders among wild-type patients [24, 53]. Recent studies showed that *KRAS* mutation detection with more sensitive method allow a better selection of patients who could benefit of anti-EGFR therapies [21, 22]. Data reported by Molinari et al. [23] emphasize the importance of sensitivity of the technique: in this paper, authors found 55% of wild-type *KRAS* with standard assay. After using more sensitive assays like MALDI-TOF MS, mutant-enriched PCR, or engineered mutant-enriched PCR, the authors found 27% of these samples identified as wild type bearing a *KRAS* mutation. Our data are consistent with the results of this paper and confirm the importance of a rapid and sensitive assay to avoid false negative. To our opinion, the real-time PCR assays allow to achieve relatively high sensitivity using simple and affordable techniques easily accessible for routine analysis.

Acknowledgments

This study was performed within the framework of the "Plateforme de Génétique Moléculaire INCa, Région Lorraine." The authors are grateful to the French Ligue Contre le Cancer, Comités Lorrains" and to all academic and private pathologists for providing tumor specimens. They thank Cindy Dubois for her work on the discordant samples.

Conflict of Interest

None declared.

References

1. Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman. 2011. Global cancer statistics. CA Cancer J. Clin. 61:69–90.
2. Amado, R. G., M. Wolf, M. Peeters, E. Van Cutsem, S. Siena, D. J. Freeman, et al. 2008. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. J. Clin. Oncol. 26:1626–1634.
3. De Roock, W., H. Piessevaux, J. De Schutter, M. Janssens, G. De Hertogh, N. Personeni, et al. 2008. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. Ann. Oncol. 19:508–515.
4. Lievre, A., J. B. Bachet, V. Boige, A. Cayre, D. Le Corre, E. Buc, et al. 2008. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. J. Clin. Oncol. 26: 374–379.
5. Lievre, A., J. B. Bachet, D. Le Corre, V. Boige, B. Landi, J. F. Emile, et al. 2006. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. Cancer Res. 66:3992–3995.
6. Karapetis, C. S., S. Khambata-Ford, D. J. Jonker, C. J. O'Callaghan, D. Tu, N. C. Tebbutt, et al. 2008. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. N. Engl. J. Med. 359:1757–1765.
7. Vaughn, C. P., S. D. Zobell, L. V. Furtado, C. L. Baker, and W. S. Samowitz. 2011. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. Genes Chromosom. Cancer 50:307–312.
8. Lievre, A., H. Blons, and P. Laurent-Puig. 2010. Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer. Oncogene 29:3033–3043.
9. Normanno, N., S. Tejpar, F. Morgillo, A. De Luca, E. Van Cutsem, and F. Ciardiello. 2009. Implications for *KRAS* status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. Nat. Rev. Clin. Oncol. 6:519–527.
10. Loupakis, F., A. Ruzzo, C. Cremolini, B. Vincenzi, L. Salvatore, D. Santini, et al. 2009. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. Br. J. Cancer 101:715–721.
11. Bokemeyer, C., I. Bondarenko, J. T. Hartmann, F. de Braud, G. Schuch, A. Zubel, et al. 2011. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. Ann. Oncol. 22:1535–1546.
12. Van Cutsem, E., C. H. Kohne, I. Lang, G. Folprecht, M. P. Nowacki, S. Cascinu, et al. 2011. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. J. Clin. Oncol. 29:2011–9.

 © 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

13. Bokemeyer, C., E. V. Cutsem, P. Rougier, F. Ciardiello, S. Heeger, M. Schlichting, et al. 2012. Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. Eur. J. Cancer 2012:23.
14. Peeters, M., A. Cohn, C. H. Kohne, and J. Y. Douillard. 2012. Panitumumab in combination with cytotoxic chemotherapy for the treatment of metastatic colorectal carcinoma. Clin. Colorectal Cancer 11:14–23.
15. Kohne, C. H., R. Hofheinz, L. Mineur, H. Letocha, R. Greil, J. Thaler, et al. 2012. First-line panitumumab plus irinotecan/5-fluorouracil/leucovorin treatment in patients with metastatic colorectal cancer. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 138:65–72.
16. Douillard, J. Y., S. Siena, J. Cassidy, J. Tabernero, R. Burkes, M. Barugel, et al. 2010. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. J. Clin. Oncol. 28:4697–4705.
17. Peeters, M., T. J. Price, A. Cervantes, A. F. Sobrero, M. Ducreux, Y. Hotko, et al. 2010. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. J. Clin. Oncol. 28: 4706–4713.
18. van Krieken, J. H., A. Jung, T. Kirchner, F. Carneiro, R. Seruca, F. T. Bosman, et al. 2008. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. Virchows Arch. 453:417–431.
19. Kohne, C. H. 2010. How to integrate molecular targeted agents in the continuum of care. Ann. Oncol. 21(suppl 7): vii134–vii139.
20. Kopetz, S., G. J. Chang, M. J. Overman, C. Eng, D. J. Sargent, D. W. Larson, et al. 2009. Improved survival in metastatic colorectal cancer is associated with adoption of hepatic resection and improved chemotherapy. J. Clin. Oncol. 27:3677–3683.
21. Tougeron, D., T. Lecomte, J. -C. Pages, C. Collin, C. Villalva, A. Ferru, et al. 2012. Effect of low-frequency KRAS mutations on the response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. J. Clin. Oncol. 30(suppl; abstr 3520), 3520.
22. Malapelle, U., C. Carlomagno, M. Salatiello, A. De Stefano, C. De Luca, R. Bianco, et al. 2012. KRAS mutation detection by high-resolution melting analysis significantly predicts clinical benefit of cetuximab in metastatic colorectal cancer. Br. J. Cancer 2012:275.
23. Molinari, F., L. Felicioni, M. Buscarino, S. De Dosso, F. Buttitta, S. Malatesta, et al. 2011. Increased detection sensitivity for KRAS mutations enhances the prediction of anti-EGFR monoclonal antibody resistance in metastatic colorectal cancer. J. Clin. Oncol. 17:4901–4914.
24. Perkins, G., A. Lievre, C. Ramacci, T. Meatchi, A. de Reynies, J. F. Emile, et al. 2010. Additional value of EGFR downstream signaling phosphoprotein expression to KRAS status for response to anti-EGFR antibodies in colorectal cancer. Int. J. Cancer 127:1321–1331.
25. Krypuy, M., G. M. Newnham, D. M. Thomas, M. Conron, and A. Dobrovic. 2006. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. BMC Cancer. 6:295.
26. Schimanski, C. C., U. Linnemann, and M. R. Berger. 1999. Sensitive detection of K-ras mutations augments diagnosis of colorectal cancer metastases in the liver. Cancer Res. 59:5169–5175.
27. Bouali, S., A. S. Chretien, C. Ramacci, M. Rouyer, P. Becuwe, and J. L. Merlin. 2009. PTEN expression controls cellular response to cetuximab by mediating PI3K/AKT and RAS/RAF/MAPK downstream signaling in KRAS wild-type, hormone refractory prostate cancer cells. Oncol. Rep. 21:731–735.
28. Lee, S., V. H. Brophy, J. Cao, M. Velez, C. Hoeppner, S. Soviero, et al. 2011. Analytical performance of a PCR assay for the detection of KRAS mutations (codons 12/13 and 61) in formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples of colorectal carcinoma. Virchows 460:141–149.
29. Weichert, W., C. Schewe, A. Lehmann, C. Sers, C. Denkert, J. Budczies, et al. 2009. KRAS genotyping of paraffin-embedded colorectal cancer tissue in routine diagnostics: comparison of methods and impact of histology. J. Mol. Diagn. 12:35–42.
30. Gonzalez-Bosquet, J., J. Calcei, J. S. Wei, M. Garcia-Closas, M. E. Sherman, S. Hewitt, et al. 2011. Detection of somatic mutations by high-resolution DNA melting (HRM) analysis in multiple cancers. PLoS ONE 6:e14522.
31. Do, H., M. Krypuy, P. L. Mitchell, S. B. Fox, and A. Dobrovic. 2008. High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. BMC Cancer 8:142.
32. Wittwer, C. T. 2009. DNA High-resolution melting analysis: advancements and limitations. Hum. Mutat. 30:857–859.
33. Custodio, A, and J. Feliu. In press. Prognostic and predictive biomarkers for epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer: beyond KRAS mutations. Crit. Rev. Oncol. Hematol.
34. van Krieken, H., and J. Tol. 2009. Setting future standards for KRAS testing in colorectal cancer. Pharmacogenomics 10:1–3.
35. De Roock, W., D. J. Jonker, F. Di Nicolantonio, A. Sartore-Bianchi, D. Tu, S. Siena, et al. 2010. Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. JAMA 304:1812–1820.
36. Tejpar, S., I. Celik, M. Schlichting, U. Sartorius, C. Bokemeyer, and E. Van Cutsem. 2012. Association of KRAS G13D tumor mutations with outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. J. Clin. Oncol. 2012:25.
37. De la Vega, F. M., K. D. Lazaruk, M. D. Rhodes, and M. H. Wenz. 2005. Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP Genotyping Assays and the SNPlex Genotyping System. Mutat. Res. 573:111–135.
38. Gibson, N. J. 2006. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. Clin. Chim. Acta 363:32–47.
39. De Roock, W., B. Claes, D. Bernasconi, J. De Schutter, B. Biesmans, G. Fountzilas, et al. 2010. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. Lancet Oncol. 11:753–762.
40. Edkins, S., S. O'Meara, A. Parker, C. Stevens, M. Reis, S. Jones, et al. 2006. Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. Cancer Biol. Ther. 5:928–932.
41. Chang, Y. S., K. T. Yeh, T. J. Chang, C. Chai, H. C. Lu, N. C. Hsu, et al. 2009. Fast simultaneous detection of K-RAS mutations in colorectal cancer. BMC Cancer 9:179.
42. Fadhil, W., S. Ibrahem, R. Seth, and M. Ilyas. 2010. Quick-multiplex-consensus (QMC)-PCR followed by high-resolution melting: a simple and robust method for mutation detection in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. J. Clin. Pathol. 63:134–140.
43. Lamy, A., F. Blanchard, F. Le Pessot, R. Sesboue, F. Di Fiore, J. Bossut, et al. 2011. Metastatic colorectal cancer KRAS genotyping in routine practice: results and pitfalls. Mod. Pathol. 24:1090–1100.
44. Lievre, A., P. Artru, M. Guiu, P. Laurent-Puig, J.-L. Merlin, J.-C. Sabourin, et al. 2012. Review of the current status of KRAS mutation testing in France in 2011: the Flash-KRAS study. J. Clin. Oncol. 30(suppl; abstr e14129), e14129.
45. Inoue, T., K. Nabeshima, H. Kataoka, and M. Koono. 1996. Feasibility of archival non-buffered formalin-fixed and paraffin-embedded tissues for PCR amplification: an analysis of resected gastric carcinoma. Pathol. Int. 46:997–1004.
46. Hofman, V., M. Ilie, V. Gavric-Tanga, V. Lespinet, M. Mari, S. Lassalle, et al. 2010. Role of the surgical pathology laboratory in the pre-analytical approach of molecular biology techniques. Ann. Pathol. 30:85–93.
47. Penault-Llorca, F., A. Vincent-Salomon, J. P. Bellocq, M. C. Matthieu, G. M. Grogan, I. Treilleux, et al. 2010. [Update of the GEFPICS' recommendations for HER2 status determination in breast cancers in France]. Ann. Pathol. 30:357–373.
48. Bibeau, F., H. Frugier, A. DenouelJ. C. Sabourin, and F. Boissiere-Michot. 2009. [Technical considerations for KRAS testing in colorectal cancer. The pathologist's point of view]. Bull. Cancer 96:S15–S22.
49. Gallegos Ruiz, M. I., K. Floor, F. Rijmen, K. Grunberg, J. A. Rodriguez, and G. Giaccone. 2007.EGFR and K-ras mutation analysis in non-small cell lung cancer: comparison of paraffin embedded versus frozen specimens. Cell Oncol. 29:257–264.
50. Marchetti, A., L. Felicioni, and F. Buttitta. 2006. Assessing EGFR mutations. N. Engl. J. Med. 354:526–528; author reply -8.
51. Forbes, S., J. Clements, E. Dawson, S. Bamford, T. Webb, A. Dogan, et al. 2006. Cosmic 2005. Br. J. Cancer 94:318–322.
52. Linardou, H., I. J. Dahabreh, D. Kanaloupiti, F. Siannis, D. Bafaloukos, P. Kosmidis, et al. 2008. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. Lancet Oncol. 9:962–972.
53. Bardelli, A., and S. Siena. 2010. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. J. Clin. Oncol. 28:1254–1261.

 © 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

II.3. Comparaison des techniques Cobas 4800 KRAS, PCR TaqMan, PCR HRM pour la détection des mutations du gène KRAS dans des échantillons de carcinomes colorectaux fixés au formol et inclus en paraffine

Toujours dans un but d'amélioration des techniques existantes, notamment de la sensibilité et de la sensibilité, ainsi que des délais de rendu des résultats, les industriels du diagnostic ont commencé à commercialiser des kits de réactifs CE-IVD, c'est à dire validés selon les normes Européennes (CE) et autorisés pour le diagnostic *in-vitro* (IVD). C'est le cas du kit de Roche Diagnostic destiné à un thermocycleur appelé Cobas®. Le kit *KRAS* Cobas® permet de déterminer de manière spécifique et sensible le statut mutationnel du gène *KRAS* au niveau des codons 12, 13 et 61. Dans un article paru en 2013 (Harlé A., Rouyer M., Harter V., Genin P., Leroux A., Merlin J.L Comparison of COBAS 4800 KRAS, TaqMan PCR and High Resolution Melting PCR assays for the detection of KRAS somatic mutations in formalin-fixed paraffin embedded colorectal tumors. *Virchows Archives. 2013 Mar;462(3):329-35.)*, nous avons voulu comparer ce kit « clé en main » aux techniques développées au laboratoire. Dans cette étude nous avons en particulier étudié la sensibilité diagnostique ainsi que la spécificité entre les différentes techniques, en l'occurrence ce kit commercial (Kit Cobas® de Roche Diagnostics) et nos techniques habituelles de PCR TaqMan et de PCR HRM.

Introduction

Beaucoup d'études documentent l'influence du statut mutationnel de *KRAS* sur la réponse aux anti-EGFR chez les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique. Le système Cobas® 4800, marqué CE-IVD, permet l'utilisation de kits basés sur la PCR en temps-réel et plus précisément la

technologie TaqMelt. Ce kit permet la détection de 19 mutations différentes situées sur les exons 2 et 3 de *KRAS*.

Matériel & Méthode

Nous avons comparé lors de cette étude les résultats de génotypages *KRAS* obtenus avec des méthodes précédemment validées, la PCR TaqMan et la PCR HRM. Cent-cinquante-six échantillons ont été analysés pour cette étude après extraction de l'ADN depuis des fragments de tumeurs fixés et inclus en paraffine. Cent-trente-deux échantillons ont été analysés à la fois par la méthode Cobas® et par la méthode TaqMan et 92 échantillons ont été analysés à la fois par la méthode Cobas® et par la méthode HRM. L'extraction de l'ADN de 40 échantillons a été réalisée selon deux méthodes différentes (Qiagen QiAmp kit et Roche Cobas DNA kit) afin de les comparer.

Résultats

Sur les 156 échantillons analysés, 132 échantillons ont donné des résultats interprétables à la fois par la méthode Cobas® et par la méthode TaqMan et 92 échantillons ont donné des résultats interprétables à la fois par la méthode Cobas® et par la méthode HRM. Aucune différence statistiquement significative n'a été retrouvée entre la méthode Cobas® et la méthode TaqMan (k=0,937 ; 4 cas discordants dont 3 concernant la présence d'une mutation sur le codon 61 qui n'est pas recherchée par la méthode TaqMan et 1 cas discordant concernant une mutation du codon 12 non recherchée par la méthode TaqMan). Aucune différence statistiquement significative n'a été retrouvée entre la méthode Cobas® et la méthode HRM (k=0,891 ; 5 cas discordants dont 3 concernant la présence d'une mutation sur le codon 61 qui n'est pas recherchée par la méthode TaqMan et 2 cas discordants concernant une mutation sur l'exon 2, pour lesquelles la technique HRM ne s'est pas révélée suffisamment sensible). Aucune différence significative n'a été retrouvée entre les deux techniques d'extraction.

Conclusion

Les 3 méthodes (Cobas®, TaqMan et HRM) sont capables de détecter de manière précise la présence de mutation du gène *KRAS* sur des fragments de tissus tumoraux fixés et inclus en paraffine. Les techniques Cobas® et TaqMan se sont révélées plus robustes que la méthode HRM compte tenu du nombre d'échantillons non interprétables moins important avec ces deux techniques. Les deux méthodes d'extraction d'ADN donnent quant à elles des résultats équivalents. Cette étude montre qu'un pré-screening de mutations par technique Cobas® puis la caractérisation des mutations par méthode TaqMan peut constituer une approche simple et fiable pour la routine diagnostique.

Author's personal copy

Virchows Arch
DOI 10.1007/s00428-013-1380-x

ORIGINAL ARTICLE

Comparison of COBAS 4800 *KRAS*, TaqMan PCR and High Resolution Melting PCR assays for the detection of *KRAS* somatic mutations in formalin-fixed paraffin embedded colorectal carcinomas

Alexandre Harlé · Benoit Busser · Marie Rouyer · Valentin Harter · Pascal Genin · Agnès Leroux · Jean-Louis Merlin

Received: 10 August 2012 / Revised: 19 December 2012 / Accepted: 29 January 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Many studies documented the influence of *KRAS* mutation status on the response of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) to anti-EGFR monoclonal antibodies. The COBAS 4800 *KRAS* is an assay using real time PCR and TaqMelt technology, CE-IVD validated, for the detection of 19 *KRAS* somatic mutations in exons 2 and 3. We compared COBAS with previously validated PCR TaqMan and High Resolution Melting (HRM) assays on 156 formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) specimens of colorectal carcinoma. DNA extraction procedures, using the Qiagen QiAMP kit and the Roche COBAS DNA kit, were also compared. Of the 156 samples, 132 were interpretable using COBAS and TaqMan and 92 using COBAS and HRM. No statistically significant difference was found between COBAS/TaqMan and COBAS/HRM (k=0.937; p<0.001 — four discordant cases were found, mostly concerning codon 61 mutations and k=0.891; p<0.001 — five discordant cases were found, three regarding codon 61 and two on codon 12/13, respectively). No difference was found between the two DNA extraction methods (t=1.7185; dol=39; α=5 %). The three assays were found suitable to detect accurately *KRAS* mutations in colon FFPE specimens. COBAS and TaqMan were found to be more robust than HRM, as they yielded fewer non-interpretable results. DNA extraction kits were found to provide equivalent results. The present study shows that pre-screening using COBAS with further TaqMan mutation characterization constitutes an easy and reliable approach for routine diagnostic purposes

Keywords KRAS · TaqMan · HRM · COBAS · Colorectal cancer · FFPE

A. Harlé (✉) · M. Rouyer · P. Genin · A. Leroux · J.-L. Merlin
Service de Biopathologie, Institut de Cancérologie de Lorraine,
6 Avenue de Bourgogne – CS 30519,
54519 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France
e-mail: a.harle@nancy.unicancer.fr

A. Harlé · A. Leroux · J.-L. Merlin
CNRS, UMR 7039 CRAN, Nancy, France

A. Harlé · A. Leroux · J.-L. Merlin
Université de Lorraine, Nancy, France

B. Busser
UJF Grenoble 1/Inserm U823, Grenoble, France

V. Harter
Département de biostatistiques, Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the second most common cause of cancer with more than one million new cases diagnosed every year [1]. The World Health Organization estimates that 608,000 people die every year from clinical complications and metastasis of CRC.

A variety of studies have shown the importance of the *KRAS* oncogene in the treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC) and its implication in the response of patients to the anti-EGFR monoclonal antibodies cetuximab or panitumumab [2–6]. Several methods have been described for the detection of *KRAS* mutations in formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissues [5, 7, 8]. Whereas

Published online: 12 February 2013

Author's personal copy

direct sequencing is always considered as the gold standard, the most sensitive methods are considered to be real-time PCR based assays [9, 10]. *KRAS* testing is now mandatory for the prescription of anti-EGFR monoclonal antibody therapies, but a single standard method has not been recommended [11].

The COBAS 4800 *KRAS* assay (Roche Diagnostics) is a CE IVD validated assay using real time PCR and TaqMelt technology [12]. This assay accurately detects 19 *KRAS* somatic mutations in exon 2 (codons 12/13) and exon 3 (codon 61) in tumor specimen containing at least 5 % of mutated DNA. This assay was earlier compared with sequencing (Sanger Plus 454) and validated, taking endogenous and exogenous interfering factors such as silent mutations, proportion of necrotic tissue or microorganisms into consideration [12].

Mutations of the *KRAS* gene most commonly are on codon 12 (c.35 G>A – p.G12D; c.35 G>T – p.G12V; c.34 G>T – p.G12C; c.34 G>A – p.G12S; c.35 G>C – p.G12A and c.34 G>C – p.G12R) and codon 13 (c.38 G>A – p.G13D), which together represent 90 % of all mutations [13]. Mutations on codon 61 and codon 146 are found in 2.1 % and 1.9 % of cases, respectively [14]. Only one retrospective study showed an impact of mutations in codon 61 or codon 146 on the response to anti-EGFR therapy in mCRC [15]. As reported in the OPUS [16] and CRYSTAL [17] studies, codon 12 and 13 mutations are clearly predictive of response to cetuximab in combination with FOLFOX or FOLFIRI, respectively. A pooled analysis of both studies showed that addition of cetuximab to the treatment of patients with a *KRAS* wild-type mCRC improves progression free survival and overall survival [18]. More recently, addition of cetuximab to first-line chemotherapy has been reported as potentially adding benefit to patients with *KRAS* G13D-mutant tumors [19].

Based on this knowledge, *KRAS* mutation detection plays a major role in the selection of first line therapies and reliable *KRAS* mutation detection has become mandatory.

The aim of this study, conducted in the Institut de Cancérologie de Lorraine (Nancy, France), was to compare three PCR-based *KRAS* mutations assays in terms of reliability and sensitivity of the results in order to provide optimal care to mCRC patients through optimal selection of first line therapy. High Resolution Melting PCR (HRM) [8], TaqMan PCR [4] and COBAS 4800 *KRAS* [12] techniques were compared.

Patients and methods

Patients

A total of 156 FFPE biopsies and initial surgical resection specimens from mCRC patients were addressed for routine *KRAS* mutation detection from academic and private pathology laboratories to the Institut de Cancérologie de Lorraine Biopathology Department from March to June 2012. Of the 156 samples, 156 were processed with COBAS and TaqMan and 120 with COBAS and HRM. Ninety-two of 120 samples were interpretable with COBAS and HRM and 132 samples of 156 were interpretable with COBAS and TaqMan. Of these 132 samples, 108 were from primary colorectal carcinomas (81.8 %) and 16 from metastatic sites (12.1 %) This information was not available for eight samples (6.1 %). The M/F sex ratio was 1.28 and the median age was 68.4 years (Table 1).

Study design

All specimens were examined by a senior pathologist, macrodissected and processed according to the French National Cancer Institute (INCa) guidelines. DNA was extracted from all samples and processed for *KRAS* mutations analysis using COBAS, TaqMan PCR and HRM PCR. A total of 156 samples were analyzed with COBAS, 150 with TaqMan PCR and 120 with HRM PCR. Non-interpretable samples were processed twice. Samples with an invalid flag with COBAS, or no DNA amplification or with more than 40 Ct with TaqMan or HRM, were considered as non-interpretable. Forty samples were randomly selected and processed for DNA extraction using QiAMP DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) and with Roche COBAS DNA Sample Preparation kit (Roche Diagnostics). These 40 samples were then processed with the three assays to evaluate the influence of the extraction procedure on DNA quality and on the interpretability of the results.

All data were finally collected and compared. The study scheme is summarized in Fig. 1.

Table 1 Patients and samples characteristics

Characteristics	*n*
Total patients	156
Evaluable Patients	132
Median age (range), years	68 (27–96)
Gender, *n* (%)	
Male	74 (56 %)
Female	58 (44 %)
Sites, *n* (%)	
Primary	108 (82 %)
Metastasis	16 (12 %)
Unknown	8 (6 %)
Tumor content	
Range (%)	(5–95 %)
Low (<20 %) (%)	39 (30 %)
High (>20 %) (%)	89 (67 %)
Unknown (%)	4 (3 %)

Author's personal copy

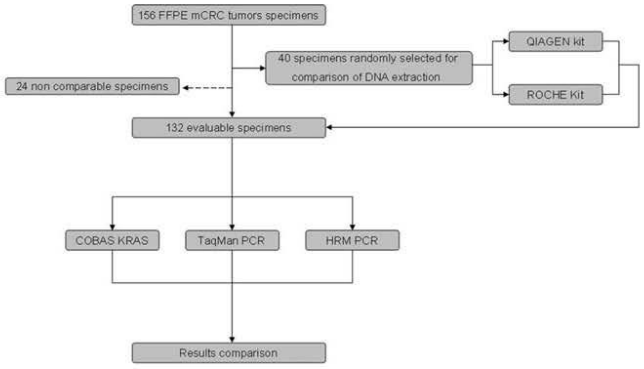


Fig. 1 Study design. 156 formalin-fixed paraffin embedded mCRC tumor specimens were selected and processed using COBAS 4800 KRAS, TaqMan PCR and HRM PCR. In 40 randomly selected specimens, DNA extraction using Roche DNA preparation sample kit and Qiagen QiAMP DNA FFPE Tissue kit was compared

DNA extraction

Tumor specimens were macrodissected after hematoxylin eosin slide examination by a senior pathologist to evaluate the percentage of tumor tissue in the sample selected for DNA extraction.

For COBAS extraction, two 5-µm-thick serial sections were cut from each paraffin block and collected in Eppendorf® vials. DNA isolation was performed using Roche COBAS DNA Sample preparation Kit (Roche Diagnostics, Meylan, France) as described in the manufacturer protocol.

For 40 randomly selected specimens, DNA isolation was performed using both the Roche COBAS DNA Sample Preparation kit as described above and the QiAMP DNA FFPE Tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). For the Qiagen kit, five 10-µm-thick serial sections were cut from each paraffin block and collected in Eppendorf® vials. Paraffin was removed by extraction with toluene and after centrifugation the pellet was washed with ethanol, centrifuged again and resuspended in 180 µl of tissue lysis buffer (ATL buffer, Qiagen) and 20 µl of proteinase K. The sample was gently mixed, incubated at 56 °C for 1 h and then at 90 °C for 1 h under agitation. DNA was extracted with MinElute Columns (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations.

Table 2 Agreement analyses between COBAS and TaqMan assays

PCR TaqMan			
n=132	MD	MND	Totals
COBAS KRAS			
MD	51	4	55
MND	0	77	77
Totals	51	81	132
Positive agreement: 100 % CI 95 % [93.0 %; 100.0 %]			
Negative agreement: 95.1 % CI 95 % [88.0 %; 98.1 %]			

MD mutation detected, *MND* mutation non detected

For both extraction procedures, DNA was finally eluted in a volume of 100 µl and diluted to have a final concentration of 2 ng/µl for COBAS and 20 ng/µl for TaqMan PCR and HRM PCR. DNA extracts from cell lines bearing G12S (LS123), G12V (SW620), G12C (H358), G12D (A427), G12A (H1573) and G13D (LoVo) mutations and DNA bearing G12R mutation were used as positive controls. DNA extracted from the WiDr cell line was used as wild type negative control. DNA concentrations were assessed twice using a Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany).

COBAS 4800 KRAS

The CE-IVD marked TaqMelt PCR assay COBAS 4800 *KRAS* (Roche Diagnostics) was used according to the manufacturer's protocol based on previously validated data [12]. Samples (50 ng of DNA) were aliquoted in 96 well plates (Roche Diagnostics) and negative and positive controls from the kit were added. Data were automatically processed by COBAS software. All samples were processed once, as recommended by the manufacturer.

TaqMan PCR

TaqMan allelic discrimination assay [4] was used to detect the presence of the seven most common *KRAS* mutations in mCRC (codon 12: G12D, G12V, G12C, G12S, G12A, G12R ; codon 13: G13D). Specific probes for mutated and non-mutated alleles were labelled at their 5′-end with the fluorescence reporter dyes FAM and VIC, respectively. Reactions were performed in 5 µl comprising 20 ng of DNA using 384-well plates (Roche Diagnostics), specific primers, specific probes and TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems) as previously described [5] using a LC480 thermocycler (Roche Diagnostics). Data were finally analyzed using the LC480 software (Roche Diagnostics). All assays were performed in duplicate.

Author's personal copy

Table 3 Agreement analyses between COBAS and HRM assays

PCR HRM			
n=92	MD	MND	Totals
COBAS KRAS			
MD	42	5	47
MND	0	45	45
Totals	42	50	92
Positive agreement: 100 % CI 95 % [91.6 %; 100.0 %]			
Negative agreement: 90.0 % CI 95 % [78.6 %; 95.7 %]			

MD mutation detected, *MND* mutation non detected

HRM PCR

HRM analysis was performed using the LC 480 HRM Master kit (Roche Diagnostics) and 384 well plates (Roche Diagnostics) using LC480 thermocycler (Roche Diagnostics) as previously described [8]. Forty nanograms of DNA was amplified in a final volume of 19 µl (10 µl of Master Mix HRM LC480, 2 µl of $MgCl_2$ 25 mM, 1 µl of primers 4 µM [Eurogentec, Seraing, Belgium] and 2 µl of water). Data were finally analyzed using the LC480 software (Roche Diagnostics). All assays were performed in duplicate.

Pyrosequencing

Pyrosequencing of exon 2 was performed for samples with interassay discrepancies. For each sample, 100 ng of DNA were amplified in duplicate, using nested PCR, and then pyrosequenced on a PyroMark ID system (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The nucleotide sequence was ACTGCTGAGCGTAG for position 1 of codons 12 and 13, and TACGACTCAGATGCGTAG for position 2 of codons 12 and 13, according to a previously described method [20].

Statistics

Kappa statistics were used to compare COBAS with TaqMan PCR and COBAS with HRM PCR. Wilson's ellipse was used to determine positive and negative agreement confident intervals.

Student's *t*-test was used to compare median Ct determined with the two DNA extraction assays.

Sensitivity

The sensitivity of COBAS, PCR-HRM and PCR TaqMan assays was evaluated by mixing codon 12 mutated and wild-type DNA from cell lines (A549 as codon 12 mutated, WIDR as wild type) at 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 % and 1 % ratios. The same protocol was followed for the determination of the sensitivity for codon 13 mutations (LoVo as codon 13 mutated, WiDr as wild type).

Results

Of the 156 analyzed samples, 150 (96.2 %) were interpretable with the COBAS method, compared to 142 of 150 (94.7 %) with PCR TaqMan and 92 of 120 (76.7 %) with PCR HRM. Non-interpretable samples were analyzed a second time, but remained so with all three methods.

No statistically significant difference was found between COBAS and TaqMan (k=0.937; p<0.001). For four cases (3.0 %), discordant results were obtained, mainly regarding codon 61 mutations which were not detectable using the TaqMan PCR assay for three samples. In the fourth case, a mutation on codon 12/13 was detected using COBAS but not with TaqMan. The calculated positive agreement considering CE-IVD COBAS as reference method was 100 % CI 95 % [93.0 %; 100 %] and the negative agreement was 95.1 % CI 95 % [88.0 %; 98.1 %] (Table 2).

No statistically significant difference between COBAS and HRM was found (k=0.891; p<0.001). In five cases (5.4 %), discordant results were obtained. In three cases, a mutation on codon 61 was detected using COBAS but not with HRM and in the two remaining discordant cases a codon 12/13 mutations was only detected by COBAS and TaqMan. The calculated positive agreement considering CE-IVD COBAS as reference method was 100 % CI 95 % [91.6 %; 100 %] and the negative agreement was 90.0 % CI 95 % [78.6 %; 95.7 %] (Table 3).

Table 4 Sensitivity of the three assays

	Codon 12						Codon 13
	G12D	G12V	G12C	G12S	G12A	G12R	G13D
COBAS	2.5 % (1.25 ng)						2.5 % (1.25 ng)
TaqMan PCR	<1.0 % (0.2 ng)	<1.0 % (0.2 ng)	<1.0 % (0.2 ng)	5.0 % (1.0 ng)	2.5 % (0.5 ng)	5.0 % (1.0 ng)	2.5 % (0.5 ng)
HRM PCR	5.0 % (2.0 ng)						5.0 % (2.0 ng)

Results are expressed in % of tumoral cells and in DNA quantity in ng

Author's personal copy

Table 5 Discrepancies study

Sample ID	% of tumoral cells	COBAS	PCR TaqMan	PCR HRM	Pyrosequencing
S13/3	60	Codon 61 mutation	No mutation detected	No mutation detected	n/a
S17/3	40	Codon 61 mutation	No mutation detected	No mutation detected	n/a
S17/13	60	Codon 12/13 mutation	G12S mutation detected	No mutation detected	Invalid
S22/9	10	Codon 12/13 mutation	Invalid	No mutation detected	No mutation detected
S26/9	70	Codon 61 mutation	No mutation detected	No mutation detected	n/a
S26/13	70	Codon 12/13 mutation	No mutation detected	Mutation detected on exon 2	No mutation detected

Each sample has been run with the three assays. A fourth assay (pyrosequencing) has been used for these samples

COBAS sensitivity assays established a detection threshold of 2.5 % of mutated DNA (1.25 ng) for codon 12 and 13, while for PCR TaqMan this was less than 1 % of mutated DNA (0.2 ng) for G12D, G12V and G12C mutations, 2.5 % (0.5 ng) for G12A and G13D and 5 % (1.0 ng) for G12S and G12R. PCR HRM sensitivity assays established a detection threshold of 5 % of mutated DNA (2.0 ng) for codon 12 and 13 (Table 4).

An analysis of discrepant results is presented in Table 5. Three codon 61 mutations were only detected by COBAS. Moreover, samples presenting discrepant results between the three assays for codons 12 and 13 were only detected by pyrosequencing, with a 5 % sensitivity level for the detection of *KRAS* mutations [20].

No statistically significant difference between the two extraction methods was found ($p=0.094$; dol=39; $t=1.7185$ € [−2.0227; +2.0227]; $\alpha=5$ %) (data not shown). Moreover, no differences were found between the mutation results of Qiagen or Roche DNA extraction kits, regardless of processing with COBAS, TaqMan PCR or HRM PCR (data not shown).

Discussion

KRAS mutation analysis is now mandatory, prior to choosing anti-EGFR monoclonal antibody therapy cetuximab or panitumumab, for advanced mCRC as only patients with wild type *KRAS* tumors might respond [3, 5, 17, 21, 22]. The OPUS study showed that cetuximab does not improve progression free or overall survival for patients with a mutated *KRAS* mCRC and can even be deleterious [16, 21].

The present study addresses three key parameters impacting on the efficiency of routine *KRAS* mutation analysis: standardization of the assay method, its sensitivity and capability to identify the mutations.

There is no generally accepted standard method for the determination of *KRAS* somatic mutations and many methods are in use. Sanger sequencing remains the gold standard for detection of all possible mutations but has been reported to lack in sensitivity [23]. The need for standardization has been underlined in a European quality assurance program which showed that 30 % of evaluated laboratories do not correctly identify all *KRAS* mutations [24, 25]. The COBAS *KRAS* assay is a CE-IVD validated method and might be considered as the standard method within the limitations of the manufacturer validation protocol. Whereas pyrosequencing has a sensitivity of 5 %, this method did not confirm the results assessed with other assays. Our samples S22/9 and S26/13 were found non-mutated with pyrosequencing but this does not exclude a false positive result with COBAS or a false negative result with the other assays. Our S22/9 sample contained 10 % tumor cells, which might explain why the COBAS assay detected a mutation not found with other assays. The S26/13 sample contained a mutation in the COBAS and HRM assays but not with pyrosequencing and TaqMan. In this sample tumor heterogeneity, with a small percentage of cells with a mutation different from those assessed with TaqMan assay, as well as lower sensitivity might explain why they were not detected with TaqMan and pyrosequencing. Alternatively, this sample might have contained a non-reported mutation, which

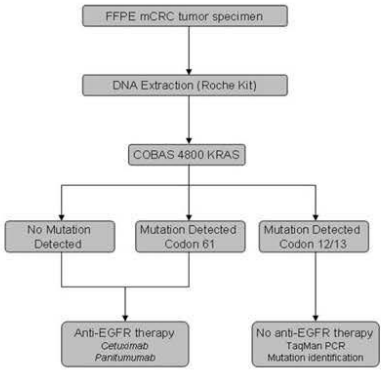


Fig. 2 Proposition scheme for a routine double-step *KRAS* mutation detection. The first step would be performed using COBAS CE-IVD assay. The "identification" second step would be performed if a mutation on codon 12/13 has been found at the first step

Author's personal copy

would have been detectable only with Sanger direct sequencing.

High sensitivity of the used *KRAS* mutation assay is crucial to minimize the risk of false negative results in tumor specimens with a low content of mutated DNA. This point has been recently reported to be of crucial importance for mCRC [26]. mCRC patients initially reported as *KRAS* wild type and not responding to cetuximab, subsequently were found false negative because the detection limit of the used direct sequencing method was too high. When re-analyzed by pyrosequencing with a lower detection limit, many tumor specimens contained a *KRAS* mutation, which might explain why they did not respond to cetuximab. The COBAS assay was designed to detect 19 mutations of *KRAS* on codons 12, 13 and 61 and requires 50 ng of DNA. It has been validated on samples containing a minimal amount of 5 % of tumor DNA [12] but experimental assays showed a sensitivity as low as 2.5 %. TaqMan PCR was designed to detect the seven most common mutations of codons 12 and 13 of *KRAS*, representing more than 98 % of all encountered mutations. This assay requires a minimal amount of 20 ng per mutation (140 ng for seven mutations) and can detect 1 % of mutated DNA. HRM PCR requires 40 ng of DNA for all exon 2 mutations. HRM PCR sensitivity allows the detection of mutations in samples containing at least 10 % of tumoral DNA.

Even though a "mutated in codon 12 and 13" result is sufficient basis for prescribing anti-EGFR monoclonal antibodies in mCRC, a growing body of evidence indicates that different mutations might have a different impact on cetuximab and panitumumab efficacy. The INCa strongly recommends that the *KRAS* mutations are identified.

Several studies suggest that addition of cetuximab to first-line chemotherapy might add a benefit to patients with a *KRAS* G13D-mutant tumor [27]. More recently this finding was confirmed on the retrospective OPUS and CRYSTAL study data (17). On the other hand, a retrospective study on a 110-patient cohort did not show any improvement of addition of cetuximab to the treatment of patients with tumors harboring G13D mutations [28].

Mutations of codon 61 have also been described as activating [29] and the limited available data suggest that resistance to cetuximab might be associated with a mutation on codon 61 [15, 30]. This controversy can only be resolved through identification of *KRAS* mutations, and we propose a two-step *KRAS* mutation detection and identification procedure as a good, safe and easy approach for diagnostic practice regarding *KRAS* mutations in mCRC. The first step would be the COBAS CE-IVD assay which accurately detects all main *KRAS* mutations in codons 12, 13 and 61. The second step would then be using Taqman, allowing the identification of codon 12 and 13 mutations as illustrated in Fig. 2.

The recent Flash-KRAS study [31] showed that in 2011 in France *KRAS* genotyping was reported in 23.6± 28.2 days. Our two-step proposal is fully consistent with the guidelines of INCa which recommends the whole assay to be completed within 2 to 3 weeks, on the basis of weekly assay rounds.

Acknowledgments The authors are grateful to the "Ligue contre le cancer" for supporting this work, to Dr. Hélène Blons (Hopital Européen Georges Pompidou, Paris, France) for kindly providing *KRAS* mutated positive controls.

Disclosures None

References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 61(2):69–90
2. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 26(10):1626–1634
3. De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, Biesmans B, Van Laethem JL, Peeters M, Humblet Y, Van Cutsem E, Tejpar S (2008) KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. Ann Oncol 19(3):508–515
4. Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouche O, Landi B, Louvet C, Andre T, Bibeau F, Diebold MD, Rougier P, Ducreux M, Tomasic G, Emile JF, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P (2008) KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. J Clin Oncol 26(3):374–379
5. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Cote JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P (2006) KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. Cancer Res 66(8):3992–3995
6. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zalcberg JR (2008) K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. N Engl J Med 359(17):1757–1765
7. Gibson NJ (2006) The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. Clin Chim Acta 363(1–2):32–47
8. Krypuy M, Newnham GM, Thomas DM, Conron M, Dobrovic A (2006) High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. BMC Cancer 6:295
9. Hancer VS, Buyukdogan M, Turkmen I, Bassullu N, Altug T, Diz-Kucukkaya R, Bulbul-Dogusoy G, Demir G (2011) Comparison of KRAS mutation tests in colorectal cancer patients. Genet Test Mol Biomark 15(11):831–834
10. Kobunai T, Watanabe T, Yamamoto Y, Eshima K (2010) The frequency of KRAS mutation detection in human colon carcinoma is influenced by the sensitivity of assay methodology: a comparison

Author's personal copy

between direct sequencing and real-time PCR. Biochem Biophys Res Commun 395(1):158–162
11. van Krieken H, Tol J (2009) Setting future standards for KRAS testing in colorectal cancer. Pharmacogenomics 10(1):1–3
12. Lee S, Brophy VH, Cao J, Velez M, Hoeppner C, Soviero S, Lawrence HJ (2011) Analytical performance of a PCR assay for the detection of KRAS mutations (codons 12/13 and 61) in formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples of colorectal carcinoma. Virchows 460(2):141–149
13. Custodio A, Feliu J (2012) Prognostic and predictive biomarkers for epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer: beyond KRAS mutations. Crit Rev Oncol Hematol 28
14. Vaughn CP, Zobell SD, Furtado LV, Baker CL, Samowitz WS (2011) Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. Gene Chromosome Canc 50(5):307–312
15. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, Masi G, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Floriani I, Bencardino K, Galluccio N, Catalano V, Tonini G, Magnani M, Fontanini G, Basolo F, Falcone A, Graziano F (2009) KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. Br J Cancer 101(4):715–721
16. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, Zubel A, Celik I, Schlichting M, Koralewski P (2011) Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. Ann Oncol 22(7):1535–1546
17. Van Cutsem E, Kohne CH, Lang I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, Shchepotin I, Maurel J, Cunningham D, Tejpar S, Schlichting M, Zubel A, Celik I, Rougier P, Ciardiello F (2011) Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. J 29(15):2011–2019
18. Bokemeyer C, Cutsem EV, Rougier P, Ciardiello F, Heeger S, Schlichting M, Celik I, Kohne CH (2012) Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. Eur J Cancer 2012:23
19. Tejpar S, Celik I, Schlichting M, Sartorius U, Bokemeyer C, Van Cutsem E (2012) Association of KRAS G13D tumor mutations with outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. J Clin Oncol 2012:25
20. Dufort S, Richard MJ, de Fraipont F (2009) Pyrosequencing method to detect KRAS mutation in formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissues. Anal Biochem 391(2):166–168
21. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos AH, Zubel A, Koralewski P (2009) Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 27(5):663–671
22. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocakova I, Ruff P, Blasinska-Morawiec M, Smakal M, Canon JL, Rother M, Oliner KS, Wolf M, Gansert J (2010) Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. J 28(31):4697–4705
23. Malapelle U, Carlomagno C, Salatiello M, De Stefano A, De Luca C, Bianco R, Marciano R, Cimminiello C, Bellevicine C, De Placido S, Troncone G (2012) KRAS mutation detection by high-resolution melting analysis significantly predicts clinical benefit of cetuximab in metastatic colorectal cancer. Br J Cancer 2012(17):275
24. Bellon E, Ligtenberg MJ, Tejpar S, Cox K, de Hertogh G, de Stricker K, Edsjo A, Gorgoulis V, Hofler G, Jung A, Kotsinas A, Laurent-Puig P, Lopez-Rios F, Hansen TP, Rouleau E, Vandenberghe P, van Krieken JJ, Dequeker E (2011) External quality assessment for KRAS testing is needed: setup of a European program and report of the first joined regional quality assessment rounds. Oncologist 16(4):467–478
25. Dequeker E, Ligtenberg MJ, Vander Borght S, van Krieken JH (2011) Mutation analysis of KRAS prior to targeted therapy in colorectal cancer: development and evaluation of quality by a European external quality assessment scheme. Virchows 459(2):155–160
26. Tougeron D, Lecomte T, Pages J-C, Collin C, Villalva C, Ferru A, Tourani J-M, Silvain C, Levillain P, Karayan-Tapon L (2012) Effect of low-frequency KRAS mutations on the response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 30(suppl; abstr 3520)
27. De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Tu D, Siena S, Lamba S, Arena S, Frattini M, Piessevaux H, Van Cutsem E, O'Callaghan CJ, Khambata-Ford S, Zalcberg JR, Simes J, Karapetis CS, Bardelli A, Tejpar S (2010) Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. Jama 304(16):1812–1820
28. Gajate P, Sastre J, Bando I, Alonso T, Cillero L, Sanz J, Caldes T, Diaz-Rubio E (2012) Influence of KRAS p.G13D mutation in patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. Clin Colorectal Cancer 2012:24
29. Der CJ, Finkel T, Cooper GM (1986) Biological and biochemical properties of human rasH genes mutated at codon 61. Cell 44(1):167–176
30. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, Kalogeras KT, Kotoula V, Papamichael D, Laurent-Puig P, Penault-Llorca F, Rougier P, Vincenzi B, Santini D, Tonini G, Cappuzzo F, Frattini M, Molinari F, Saletti P, De Dosso S, Martini M, Bardelli A, Siena S, Sartore-Bianchi A, Tabernero J, Macarulla T, Di Fiore F, Gangloff AO, Ciardiello F, Pfeiffer P, Qvortrup C, Hansen TP, Van Cutsem E, Piessevaux H, Lambrechts D, Delorenzi M, Tejpar S (2010) Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. Lancet Oncol 11(8):753–762
31. Lievre A, Artru P, Guiu M, Laurent-Puig P, Merlin J-L, Sabourin J-C, Viguier J, Bastie A, Seronde A, Ducreux M (2012) Review of the current status of KRAS mutation testing in France in 2011: the Flash-KRAS study. J Clin Oncol 30(suppl; abstr e14129)

II.4. Analyse des exons 9 et 20 du gène *PIK3CA* dans les cancers du sein par techniques PCR HRM et PCR ARMS : Corrélations avec les critères clinico-pathologiques

Les mutations de *PIK3CA* sont fréquentes dans les cancers du sein et pourraient être la clé pour prédire la réponse aux traitements anti-HER2 ou anti-PI3K dans cette pathologie (123). Dans les cancers colorectaux, le rôle de ces mutations reste encore à démontrer, les études étant souvent contradictoires (28, 116, 117). Dans un article publié en 2013 (Harlé A., Lion M., Lozano N., Husson M., Harter V., Genin P., Merlin J.L. PIK3CA exon 9 and 20 mutations analysis of breast cancers using PCR HRM and PCR ARMS: Relation with clinicopathologic criteria. *Oncology Reports. 2013 Mar;29(3):1043-52.)*, nous décrivons le développement et l'utilisation de deux techniques de détermination du statut mutationnel des exons 10 et 21 (anciennement 9 et 20 dans la littérature) du gène *PIK3CA* et leur application dans une population de patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique. Ces deux techniques (PCR HRM et PCR ARMS) sont totalement applicables au génotypage de *PIK3CA* dans les cancers colorectaux, c'est pourquoi nous avons étudié de façon rétrospective la fréquence de ces mutations dans une population de 776 patients atteints d'un cancer colorectal métastatique. Dans cette étude non encore finalisée, 8% des patients présentent des mutations de *PIK3CA*.

Introduction

La phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K) est essentielle pour la signalisation cellulaire, la prolifération, la différenciation et la survie de la cellule. La sous-unité catalytique de PI3K, codée par le gène

PIK3CA est mutée dans 18-45% dans les cancers du sein. Ces mutations sont responsables de processus oncogéniques en activant la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. Des résistances aux anti-EGFR, aux traitements hormonaux ou aux anti-PI3K ont été décrites chez certains patients dont la voie de signalisation dépendante de PI3K était activée.

Matériel & Méthode

Cette étude décrit l'étude de 149 échantillons fixés au formol et inclus en paraffine de tumeurs de patientes atteintes d'un cancer du sein infiltrant en utilisant une technique de PCR HRM (High Resolution Melting) et de 118 échantillons par une technique de PCR ARMS (Amplification Refractory Mutation System). La technique de PCR HRM développée permet de détecter la présence de mutations sur les exons 9 et 20 de *PIK3CA* et la technique PCR ARMS permet de détecter de manière spécifique les mutations E542K, E545K sur l'exon 9 et H1047R et H1047L sur l'exon 20 de *PIK3CA*.

Résultats

Aucune relation significative entre présence de mutation et réponse aux traitements anti-HER2 n'a été trouvée. Il existe cependant un lien significatif entre la présence de mutation sur l'exon 9 ou l'exon 20 de *PIK3CA* et le grade SBR (Scarff-Bloom-Richardson) de la maladie avec une fréquence plus élevée de mutations sur l'exon 9 chez les patientes de grade SBR I et sur l'exon 20 pour les patientes de grades SBR II et III. Aucune différence significative n'a été retrouvé en considérant le type de mutation. Une corrélation statistiquement significative a été trouvée entre les deux techniques de détection des mutations ($\kappa=0,845$; $p<0,001$). La PCR ARMS s'est cependant révélée plus sensible que la PCR HRM pour la détection des mutations de *PIK3CA*.

Conclusion

L'utilisation de la PCR HRM et de la PCR ARMS sont compatibles avec une activité de routine. Cette étude démontre que les techniques, développées initialement pour des tumeurs du sein, est toute à fait compatible avec l'étude de tumeurs du colon (8% de mutations du gène *PIK3CA* retrouvées dans une population de 776 patients atteints d'un cancer colorectal métastatique comme précédemment cité). Ainsi, cette technique, notamment la technique de PCR HRM, permet de screener de manière efficace la présence de mutations sur les hotspots (exons 9 et 20) de *PIK3CA* et ainsi permettre de déterminer le statut mutationnel du gène.

ONCOLOGY REPORTS

Analysis of *PIK3CA* exon 9 and 20 mutations in breast cancers using PCR-HRM and PCR-ARMS: Correlation with clinicopathological criteria

ALEXANDRE HARLÉ[1,3], MAËVA LION[1,3], NICOLAS LOZANO[1], MARIE HUSSON[1], VALENTIN HARTER[2], PASCAL GENIN[1,3] and JEAN-LOUIS MERLIN[1,3]

Departments of [1]Biopathology and [2]Biostatistics, Centre Alexis Vautrin, Vandoeuvre-lès-Nancy; [3]Research Center for Automatic Control of Nancy (CRAN), University of Lorraine, Nancy, France

Received November 1, 2012; Accepted December 7, 2012

DOI: 10.3892/or.2013.2229

Abstract. Phosphatidylinositol-3-kinases (PI3K) are essential for cell signaling, proliferation, differentiation and survival. The catalytic subunit of PI3K, encoded by the *PIK3CA* oncogene, is mutated in 18-45% of breast carcinomas. These mutations, involved in tumorigenic processes, activate the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. Resistance to anti-human epidermal growth factor receptor, hormonal or anti-PI3K therapies have been described in breast carcinomas bearing activation of the PI3K signaling pathway. The present study reports the evaluation of *PIK3CA* exon 9 and 20 mutations in 149 invasive breast cancer cases using a validated PCR-high resolution melting assay (PCR-HRM). An amplification refractory mutation system (PCR-ARMS) using allele-specific scorpion primers was used to detect hotspot mutations in exons 9 (c.1624G→A and c.1633G→A) and 20 (c.3140A→G and c.3140A→T) in 118 tumor specimens. No correlation was observed with age at diagnosis, histological type, hormone receptor and HER2 status. *PIK3CA* exon 9 and 20 mutations were found to be related to Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grade with a lower rate of mutations and a higher frequency of exon 9 mutations in SBRI and exon 20 mutations in SBRII/III tumors. No difference was observed in the incidence rates of the two different mutations screened for each exon in any subcategory. A statistically significant correlation was found between PCR-HRM and PCR-ARMS (κ=0.845; P<0.001). PCR-ARMS was found to be more sensitive than PCR-HRM (sensitivity 0.5 and 5-10% of mutated DNA, respectively). We propose that PCR-HRM and PCR-ARMS can be combined for the cost-effective routine clinical identification of *PIK3CA* mutations for the purpose of personalizing therapy for invasive breast cancers.

Correspondence to: Dr Alexandre Harlé, Department of Biopathology, Centre Alexis Vautrin, 6 Avenue de Bourgogne, CS 30159, F-54519 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France
E-mail: a.harle@nancy.unicancer.fr

Key words: *PIK3CA* mutations, breast cancer, PCR-high resolution melting assay, PCR-amplification refractory mutation system

Introduction

Female breast cancer is the most commonly diagnosed cancer with more than one million new cases every year and breast cancer is one of the leading causes of cancer-related death in women (1). The phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) pathway is a major signaling pathway in cells and is involved in essential cell processes such as metabolism, survival, proliferation, growth and motility (2). Dysregulation of the PI3K pathway occurs in a large variety of human cancers (3) and has been proven to be implicated in breast cancer development and progression (4). PI3K converts phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) to phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3). The phosphatase and tensin homolog (PTEN) antagonizes and negatively regulates PI3K by converting PIP3 to PIP2 (5).

The PI3K/AKT/mTOR pathway appears to have a major role in the response to treatment and in the development of resistance to anticancer drugs. Overactivation of the PI3K pathway downstream of human epidermal growth factor receptors (HER) can be driven by mutations of PI3K, an enzyme from the lipid kinase family involved in cell signaling. These activating mutations occur mainly on p110α, the catalytic subunit of PI3K encoded by the *PIK3CA* (phosphoinositide-3-kinase, catalytic, α polypeptide) gene located on chromosome 3. *PIK3CA* mutations are present in 25% of breast carcinomas, and the most common activating mutations occur on exons 9 and 20 according to the COSMIC database (Catalogue Of Somatic Mutations in Cancer Database, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge; accessed June 2012; http://www.sanger.ac.uk). More precisely, E542K (c.1624G→A, p.Glu542Lys), E545K (c.1633G→A, p.Glu545Lys) in exon 9 and H1047R (c.3140A→G, p.His1047Arg), H1047L (c.3140A→T, p.His1047Leu), represent more than 90% of the mutations encountered in breast carcinomas. These four mutations have been shown to have an oncogenic role in breast cancers (6-9).

Recent studies have shown that PI3K may be implicated in the resistance of breast cancers to anti-estrogen therapy agents (10,11), anti-HER2 tyrosine kinase inhibitor (lapatinib) (12) and anti-HER2 monoclonal antibody (trastuzumab) (5,11,13). Mutations of *PIK3CA* and loss of the PTEN protein are keys

Table I. Relationship between the *PIK3CA* mutation status analyzed using PCR-HRM and main standard clinicopathological and biological characteristics of the breast cancer cases.

		No. of patients (%)		
	Total/class	*PIK3CA* wild-type	*PIK3CA* mutated	P-value[a]
Total	118 (100.0)	88 (72.5)	30 (27.5)	
Age at diagnosis (years)				
≤50	36 (30.5)[f]	26 (72.2)[g]	10 (27.8)	0.873
>50	82 (69.5)	62 (75.6)	20 (24.4)	
Tumor histology				
Ductal	102 (86.4)	73 (71.6)	29 (28.4)	0.137
Lobular	15 (12.7)	14 (93.3)	1 (6.7)	
Others	1 (0.8)	1 (100.0)	0 (0.0)	
Estrogen receptor (ER) α status[b]				
Positive	94 (81.7)	71 (75.5)	23 (24.5)	0.910
Negative	21 (19.3)	15 (71.4)	6 (28.6)	
Progesterone receptor (PR) status[b]				
Positive	74 (64.3)	57 (77.0)	17 (23.0)	0.603
Negative	41 (35.7)	29 (70.7)	12 (29.3)	
HER2 status[b]				
Positive[c]	12 (10.4)	9 (75.0)	3 (25.0)	1.000
Negative	103 (89.6)	77 (74.8)	26 (25.2)	
Hormone receptor (HR) status[b,d]				
Positive	95 (82.3)	72 (75.8)	23 (24.2)	0.796
Negative	20 (27.7)	14 (70.0)	6 (30.0)	
Combined HER and HR status[b]				
$HER2^+/HR^+$	8 (7.0)	7 (87.5)	1 (12.5)	0.575
$HER2^-/HR^+$	87 (7.6)	65 (74.7)	22 (25.3)	
$HER2^+/HR^-$	4 (3.5)	2 (50.0)	2 (50.0)	
$HER2^-/HR^-$	16 (13.9)	12 (75.0)	4 (25.0)	
SBR grade[e]				
I	14 (11.9)	8 (57.1)	6 (42.9)	0.050
II	56 (47.5)	39 (69.6)	17 (30.4)	
III	48 (40.7)	41 (85.4)	7 (14.6)	

[a]χ^2 or Fisher's exact test. [b]Information available for 115 patients. [c]HER2 (3+) by immunohistochemistry or FISH-positive; [d]HR^+, ER^+ and/or PR^+; HR^-, ER^- and PR^-. [e]Scarff-Bloom-Richardson classification. [f]Refers to the total population. [g]Refers to the population of each category.

factors in the development of resistance to these drugs (14-16). Moreover, lapatinib and trastuzumab resistance can occur in HER2-amplified breast cancers bearing a *PIK3CA* mutation (5,14,15). HER2 overexpression in breast cancers is present in 15-25% of tumors (17,18). Approximately 75% of the breast cancers express estrogen receptors and/or progesterone receptors and a relationship between anti-estrogen resistance and activation of the PI3K pathway has recently been found (11). These new findings imply that the PI3K pathway may be an important target for novel targeted therapies.

New anti-PI3K and anti-mTOR drugs are currently under development (19,20) for breast cancer treatment. Activation of the PI3K/AKT pathway and overexpression of PI3K may play a major role in the use of new therapeutic schemes, and identification of *PIK3CA* mutations could be a major biomarker for predicting the response to these new therapies.

In light of these issues, there is a huge interest in developing rapid, reliable and sensitive methods that can be used for clinical routine detection of *PIK3CA* mutations in breast tumors. In the present study, we used a polymerase chain reaction (PCR)-high resolution melting assay (HRM) and a PCR-amplification refractory mutation system (ARMS) to analyze alcohol-formalin-acetic acid (AFA)-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens. PCR-HRM is a cost-effective post-PCR method that enables the identification of alterations in single nucleotides, i.e., mutations through the analysis of thermal denaturation of double-stranded DNA. PCR-ARMS is a powerful mutation-specific real-time

Table II. Relationship between *PIK3CA* mutation status analyzed using PCR-ARMS and the main standard clinicopathological and biological characteristics of the breast cancer cases.

		No. of patients (%)		
	Total/class	*PIK3CA* wild-type	*PIK3CA* mutated	P-value[a]
Total	149 (100.0)	122 (81.9)	27 (18.1)	
Age at diagnosis (years)				
≤50	48 (30.5)[f]	36 (72.2)[g]	12 (27.8)	0.202
>50	101 (69.5)	86 (75.6)	15 (24.4)	
Tumor histology				
Ductal	127 (85.2)	102 (71.6)	25 (28.4)	0.521
Lobular	19 (12.8)	17 (93.3)	2 (6.7)	
Others	3 (2.0)	2 (66.7)	1 (33.3)	
Estrogen receptor (ER) α status[b]				
Positive	113 (81.7)	93 (75.5)	20 (24.5)	0.981
Negative	30 (19.3)	24 (71.4)	6 (28.6)	
Progesterone receptor (PR) status[b]				
Positive	88 (64.3)	71 (77.0)	17 (23.0)	0.823
Negative	55 (35.7)	46 (70.7)	9 (29.3)	
HER2 status[b]				
Positive[c]	19 (10.4)	16 (75.0)	3 (25.0)	1.000
Negative	124 (89.6)	101 (74.8)	23 (25.2)	
Hormone receptor (HR) status[b,d]				
Positive	115 (82.3)	95 (75.8)	20 (24.2)	0.823
Negative	28 (27.7)	22 (70.0)	6 (30.0)	
Combined HER and HR status[b]				
$HER2^+/HR^+$	13 (7.0)	12 (87.5)	1 (12.5)	0.593
$HER2^-/HR^+$	102 (7.6)	83 (74.7)	19 (25.3)	
$HER2^+/HR^-$	6 (3.5)	4 (50.0)	2 (50.0)	
$HER2^-/HR^-$	22 (13.9)	18 (75.0)	4 (25.0)	
SBR grade[e]				
I	14 (11.9)	7 (57.1)	7 (42.9)	0.004
II	67 (47.5)	55 (69.6)	12 (30.4)	
III	64 (40.7)	56 (85.4)	8 (14.6)	

[a]χ^2 or Fisher's test. [b]Information available for 143 patients. [c]HER2 (3+) by immunohistochemistry or FISH-positive; [d]HR^+, ER^+ and/or PR^+; HR^-, ER^- and PR^-. [e]Scarff-Bloom-Richardson classification. [f]Refers to the total population. [g]Refers to the population of each category.

PCR-based technique combining ARMS and a bi-functional fluorescent probe/primer molecule (Scorpion).

The present study evaluated the relationship between *PIK3CA* exon 9 and 20 mutations and conventional clinicopathological criteria and compared the sensitivity of the two techniques by examining the correlation of the results achieved using both methods. The final goal was to validate a double technique approach, ensuring a cost-effective, rapid process yielding a high quality level of analysis, according to the recommendations of the French National Cancer Institute (INCa) for clinical routine analysis of mutations in tumors in a treatment-choosing process. In such a context, PCR-HRM could be proposed to determine the *PIK3CA* mutational status yielding binary results (mutated or wild-type) and PCR-ARMS-Scorpion to accurately identify the four main hotspot mutations of *PIK3CA*.

Patients and methods

Population. One hundred and forty-nine invasive breast carcinoma tumor specimens, from patients diagnosed between 2008 and 2009, were retrospectively included in this study. All specimens were collected as AFA-fixed paraffin-embedded tissues from our institutional Biobank. The tumor characteristics of this population were consistent with literature data regarding mean age at diagnosis, histological type (ductal and lobular), Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grade as well as hormone receptor and HER2 status (Tables I and II). According to the Biobank procedure of our institute, all women involved in this study were informed that their tumor samples might be used for research purposes and had the opportunity to decline. No opposition was expressed.

DNA extraction. For each tumor specimen, hematoxylin and eosin slide analysis was conducted by a pathologist to ensure a minimum of 20% tumor tissue content as recommended in previous studies (21). Selected areas were macrodissected and 5 10-μm serial sections were cut from each paraffin block and collected in RNAase DNAase-free vials (SafeSeal Microcentrifuge Tubes, Sorenson Biosciences, Salt Lake City, UT, USA). Paraffin was removed by extraction with toluene (VWR BDH Prolabo, Fontenay Sous Bois, France) and centrifuged. DNA isolation was performed using the QIAamp DNA FFPE tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) protocol. The pellet was washed with ethanol, centrifuged and resuspended with 180 μl of tissue lysis buffer (ATL buffer; Qiagen) and 20 μl of proteinase K (Qiagen). The sample was then gently mixed, incubated at 56˚C for 1 h and at 90˚C for 1 h under agitation. DNA was extracted with MinElute Columns (Qiagen) as recommended by the manufacturer. The nucleic acids were eluted in a volume of 100 μl. Final concentration of eluates, ranging from 33.6 to 729.0 ng/ml, were suitable for PCR-HRM and PCR-ARMS analyses (Table III). DNA extracts from cell lines bearing E542K (Cal51), E545K (MCF7), H1047R (HCT116) and H1047R (SUM159PT) PI3-kinase mutations were used as positive controls. DNA extracted from the MDA231 cell line was used as a wild-type negative control. DNA quality was controlled using agarose gel electrophoresis with *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) as the control housekeeping gene. Only DNA with no degradation was used. DNA concentrations were determined using a Bio-photometer (Eppendorf, Hamburg, Germany).

PCR-HRM. HRM analysis was performed using the LightCycler 480® Real-Time PCR system (Roche Diagnostics, Meylan, France) and the LightCycler 480 HRM Master kit (Roche Diagnostics) in 384-well plates (Roche Diagnostics). Twenty micrograms of DNA was amplified in a final volume of 20 μl. All data and melting curves were analyzed using LightCycler SW v. 1.5.0.39 software (Roche Diagnostics). One mix was prepared for each exon. For each sample, 10 μl of Master Mix (Roche Diagnostics), 2.8 μl of $MgCl_2$ 25 mM, PCR-quality grade water and 1 μl of the primers (forward and reverse) were added. Eighteen microliters of mix was added to each well, and 2 μl of the sample was used for the analysis. One set of primers were used for each of the *PIK3CA* exons 9 and 20. All primers were designed as previously described (22).

PCR-HRM was divided into different phases: a phase of pre-incubation (10 min at 95˚C) was followed by 45 cycles of classic PCR (10 sec at 95˚C, a temperature decrease from 60 to 54˚C by 0.5˚C/cycle in 15 sec and, finally, 10 sec at 72˚C). The PCR phase was followed by the high resolution melting phase which consisted of 1 min at 95˚C, 1 min at 40˚C and a temperature increase by 0.2˚C/sec from 65 to 95˚C. A cooling phase of 1 min at 40˚C was finally performed.

PCR-ARMS. ARMS analysis was performed using the LightCycler 480 Real-Time PCR system (Roche Diagnostics) in 384-well plates. Eighty micrograms of DNA was amplified in a final volume of 20 μl. Data and fluorescence curves were analy`ed using LightCycler SW v. 1.5.0.39 software. All primers were designed as previously described (23). One mix was made for each tested mutation and all samples were proceeded as simplex. For each sample, 0.06 μl of Hot Diamond Taq polymerase (Eurogentec, Angers, France) was added together with 2 μl of reaction buffer 10X (Eurogentec), 3.2 μl of $MgCl_2$ 25 mM (Eurogentec), 0.4 μl of dNTP 10 mM (Eurogentec), PCR-quality water, 0.8 μl of ARMS primers 6.25 μM (Eurogentec) and 0.8 μl of Scorpion primers 6.25 μM (ATD Bio, Southampton, UK). Eighteen microliters of mix was added to each well, and 2 μl of the sample was used for the analysis. The mix for exon 9 mutations contained ARMS control primers for exon 15, specific ARMS primers, respectively, of E542K and E545K mutations and exon 9 and 15 specific Scorpion primers. The mix for exon 20 mutations contained ARMS control primers for exon 15, specific ARMS primers, respectively, of H1047R and H1047L mutations and exon 20 and 15 specific Scorpion primers.

Sensitivity. The sensitivity of PCR-HRM and PCR-ARMS was evaluated by mixing mutated and wild-type DNA from the cell lines at 50, 25, 10, 5, 2, 1 and 0.5% ratios.

Statistical analysis. The significance of the concordance of mutation detection using the two methods was assessed using κ statistics. $\kappa>0.8$ was considered as indicative of significance to conclude that both methods provide similar results. The χ^2 test was also used to compare mutation frequencies with those obtained from the literature. χ^2 and Fisher's exact tests were used to test for differences between classes of patients and tumors based on clinical, pathological and biological characteristics. Limit of statistical significance was set at $P<0.05$.

Results

Mutation analysis using PCR-HRM. One hundred and eighteen specimens were analyzed using PCR-HRM (Table I). *PIK3CA* mutations (exons 9 and 20) were detected in 30 (27.5%) of the specimens. No correlation was found regarding patient age (≤50 or >50 years), ductal or luminal type, estrogen and progesterone status (alone or combined as hormonal receptor status), HER2 status, and for the four subtypes identified as $HER2^+/HR^+$, $HER2^+/HR^-$, $HER2^-/HR^+$ and $HER2^-/HR^-$ (triple negative).

PIK3CA mutations were found to be correlated with SBR grade (P=0.050) with a lower mutation rate noted in the highest grades. Regarding the frequency of exon 9 and 20 mutations, a low rate of exon 9 mutations was observed in SBR grade III tumors (P=0.025) while no difference was observed for the exon 20 mutation rate. Exon 9 mutations were found to be more frequent in SBR grade I tumors while exon 20 mutations were predominantly observed in SBR grade II and III tumors.

Mutation analysis using PCR-ARMS. One hundred and forty-nine specimens were analyzed using PCR-ARMS (Table II). *PIK3CA* mutations (exons 9 and 20) were detected in 27 (18.1%) specimens. No difference was found regarding patient age (≤50 or >50 years), ductal or luminal type, estrogen and progesterone status (alone or combined as hormonal receptor status), HER2 status, and for the four subtypes ($HER2^+/HR^+$, $HER2^+/HR^-$, $HER2^-/HR^+$ and $HER2^-/HR^-$; i.e., triple negative). As with PCR-HRM, *PIK3CA* mutations were found to be related with SBR grade (P=0.004) with a lower mutation rate

Table III. Contingency table of the 102 samples analyzed by combined PCR-HRM and PCR-ARMS assays.

Sample no.	Sample DNA concentration (ng/μl)	PCR-HRM		PCR-ARMS	
		Test result	Mutation result	Test result	Mutation result
1	33.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
2	61.2	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
3	95.9	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A→G
4	64.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
5	105.2	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
6	164.4	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
7	71.1	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1624G→A
8	69.8	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
9	95.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
10	39.9	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
11	68.7	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
12	**60.7**	**Mutation detected**	**Exon 9**	**Mutation not detected**	**N/A**
13	62.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
14	108.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
15	**162.7**	**Mutation detected**	**Exon 9**	**Mutation not detected**	**N/A**
16	319.9	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
17	**221.4**	**Mutation detected**	**Exon 20**	**Mutation not detected**	**N/A**
18	109.7	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
19	146.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
20	201.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
21	199.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
22	224.7	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
23	35.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
24	201.2	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
25	175.8	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.31401→T
26	104.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
27	211.4	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
28	662.0	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1633G→A
29	457.8	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
30	223.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
31	199.8	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
32	68.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
33	122.1	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
34	232.4	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
35	252.4	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.31401→T
36	155.3	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A→G
37	75.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
38	486.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
39	164.2	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
40	204.1	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
41	**124.4**	**Mutation detected**	**Exon 9**	**Mutation not detected**	**N/A**
42	291.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
43	206.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
44	67.6	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1633G→A
45	96.4	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A→G
46	26.9	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.31401→T
47	99.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
48	**41.4**	**Mutation detected**	**Exon 9**	**Mutation not detected**	**N/A**
49	127.8	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
50	184.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
51	86.9	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
52	499.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A

Table III. Continued.

Sample no.	Sample DNA concentration (ng/μl)	PCR-HRM		PCR-ARMS	
		Test result	Mutation result	Test result	Mutation result
53	188.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
54	140.1	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
55	357.4	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
56	252.5	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A→G
57	211.7	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
58	213.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
59	230.3	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A→G
60	**227.3**	**Mutation detected**	**Exon 9**	**Mutation not detected**	**N/A**
61	729.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
62	144.4	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
63	202.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
64	45.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
65	154.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
66	301.8	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.31401→T
67	178.7	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
68	151.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
69	543.7	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
70	70.3	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1624G→A
71	179.8	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
72	202.1	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
73	244.9	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1633G→A
74	130.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
75	256.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
76	**90.2**	**Mutation not detected**	**N/A**	**Mutation detected**	**c.1624G→A**
77	302.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
78	138.8	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
79	117.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
80	130.9	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
81	120.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
82	149.4	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
83	221.2	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A→G
84	107.8	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1624G→A
85	166.1	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
86	277.2	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
87	111.1	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
88	81.1	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
89	170.2	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
90	252.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
91	127.9	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A→G
92	102.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
93	111.9	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
94	306.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
95	96.3	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A→G
96	88.7	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
97	122.6	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A→G
98	222.9	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
99	194.4	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1624G→A
100	44.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
101	185.3	Mutation detected	Exon 20	Mutation netected	c.3140A→G
102	127.3	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1624G→A

Discordant results are highlighted in bold. N/A, not applicable.

Table IV. Frequencies of mutations detected with combined PCR-ARMS and PCR-HRM assays.

Nucleotide change	Protein change	No. of samples	Relative (%)	Total (%)
PCR-ARMS				
Exon 9				
c.1624G→A	E542K	6	26.1	5.9
c.1633G→A	E545K	3	13.0	2.9
Exon 20				
c.3140A→G	H1047R	10	43.5	9.8
c.31401→T	H1047L	4	17.4	3.9
Total		23	100.0	22.5
PCR-HRM				
Exon 9	Not available	13	46.4	12.8
Exon 20	Not available	15	53.6	14.7
Total		28	100.0	27.5

Table V. Summary of the results achieved with combined PCR-HRM and PCR-ARMS assays.

	PCR-HRM		
	Mutated	Wild-type	Total
PCR-ARMS			
Mutated	22	1	23
Wild-type	6	73	79
Total	28	74	102

in the highest grades. Regarding the frequency of exon 9 and 20 mutations, a lower rate of exon 9 and exon 20 mutations was observed in SBR grade III tumors (P=0.009). Again, exon 9 mutations were found to be predominant in SBR grade I tumors (5/7) while exon 20 mutations were predominantly observed in SBR grade II and III tumors (13/20).

Comparative analysis of PCR-HRM and PCR-ARMS. One hundred and two breast tumor samples (Table III) were analyzed using both PCR-HRM and PCR-ARMS. *PIK3CA* mutations were detected (Table IV) in 28 tumors (27.5%) when PCR-HRM was used and 23 (22.5%) when PCR-ARMS was used.

Among the 28 mutated tumors (Table IV), PCR-HRM results showed that 13 (46.4%) carried a mutation on exons 9 and 15 (53.6%) on exon 20.

Among the 23 samples in which a mutation was detected using PCR-ARMS assay (Table IV), 9 (39.1%) carried a mutation in exon 9, identified as c.1624G→A in 6 cases (26.1%) and as c.1633G→A in the 3 others (13.0%). Among the remaining 14 (60.9%) specimens identified as mutated in exon 20, 10 (43.5%) carried the c.3140A→G and 4 (17.4%) the c.3140A→T mutation. No sample was found with mutations in both exons 9 and 20 with any of the assays.

Table VI. Limits of sensitivity of PCR-HRM and PCR-ARMS assays.

Nucleotide change	Protein change	Sensitivity (%)	DNA quantity (ng)
PCR-HRM			
Exon 9	Not available	5	1.0
Exon 20	Not available	10	2.0
PCR-ARMS			
Exon 9			
c.1624G→A	E542K	0.5	0.8
c.1633G→A	E545K	0.5	0.8
Exon 20			
c.3140A→G	H1047R	0.5	0.8
c.31401→T	H1047L	0.5	0.8

Sensitivity. The analytical sensitivity of each assay was evaluated from dilution of DNA extracted from *PIK3CA*-mutated cell lines into DNA from *PIK3CA* wild-type cell lines (MDA 231) from 0.5 to 50%. PCR-HRM was able to discriminate a dilution corresponding to 5% of exon 9 mutated DNA and 10% of exon 20 mutated DNA (Fig. 1, Table VI). PCR-ARMS was able to discriminate a DNA dilution corresponding to 0.5% of c.1624G→A, 0.5% of c.1633G→A, 0.5% of c.3140A→G and 0.5% of c.3140A→T mutated DNA (Fig. 2, Table VI).

Results obtained using PCR-ARMS and PCR-HRM (Table V), were found to be statistically comparable (κ=0.845, P<0.001). Contingency table is shown in Table III.

No statistical difference in the frequencies of *PIK3CA* mutations was found between results achieved with any of the two assays and data from Sanger database.

Discussion

Recent studies have shown that *PIK3CA* mutations play a major role in resistance to trastuzumab or lapatinib (5) or to hormonal therapy (11,13) of breast carcinomas and could represent a potent response predictive marker for PI3-kinase- and mTOR-targeted therapies (24) and be used as a treatment-choosing parameter. *PIK3CA* mutations are mostly located within exons 9 and 20 and four hotspots (c.1624G→A, c.1633G→A, c.3140A→G and c.3140A→T) represent more than 90% of all mutations. Although the prognostic value of *PIK3CA* mutations in breast cancer remains controversial, in a recent evaluation of 2587 breast cancers cases from 12 independent studies, Dumont *et al* (24) reported a more favorable clinical outcome in patients with *PIK3CA* mutated tumors and that improved prognosis may pertain only to patients with a mutation in the kinase domain of p110α and to post-menopausal women with estrogen-positive cancers.

The relative prognostic value of exon 9 vs. 20 mutations also remains controversial. Barbareschi *et al* (25), found that exon 9 mutations have a negative prognostic value while exon 20 mutations were associated with favorable outcome while Lai *et al* (26) reported exon 20 mutations as associated with poor prognosis. Furthermore, Lerma *et al* (27)

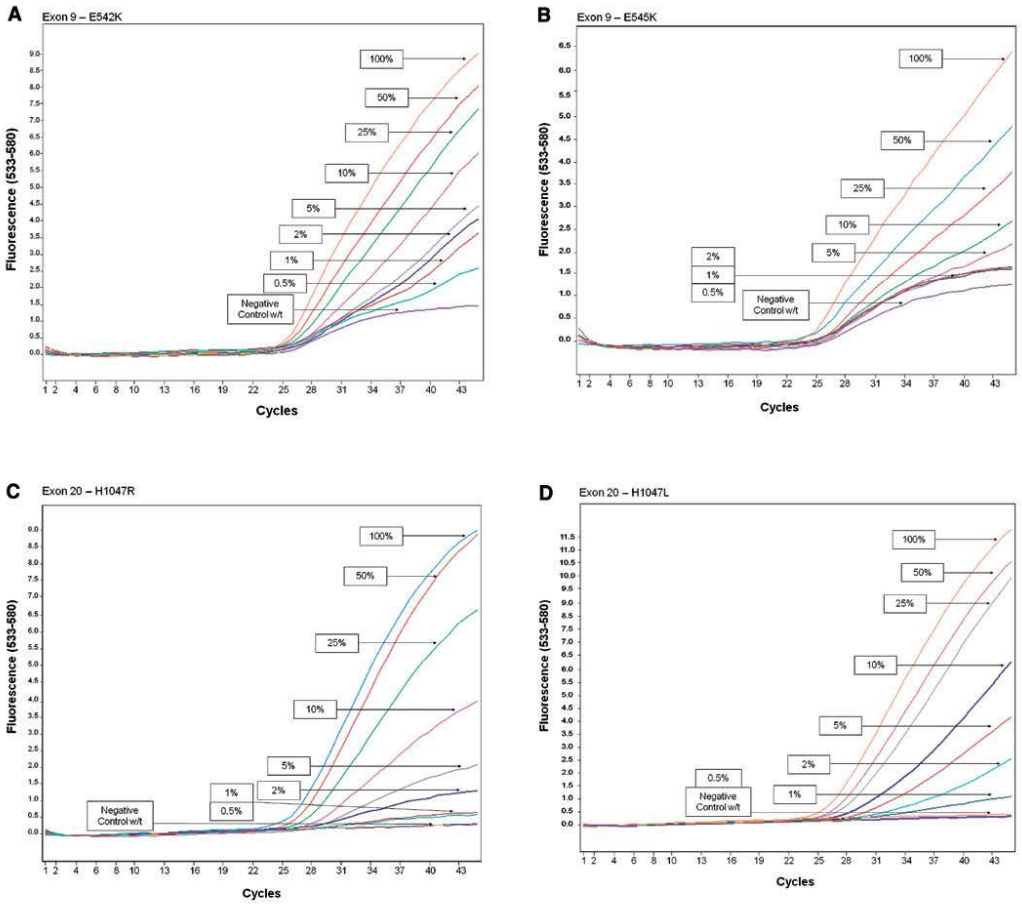


Figure 1. Sensitivity results for (A) E542K, (B) E545K, (C) H1047R and (D) H1047L mutations using PCR-ARMS.

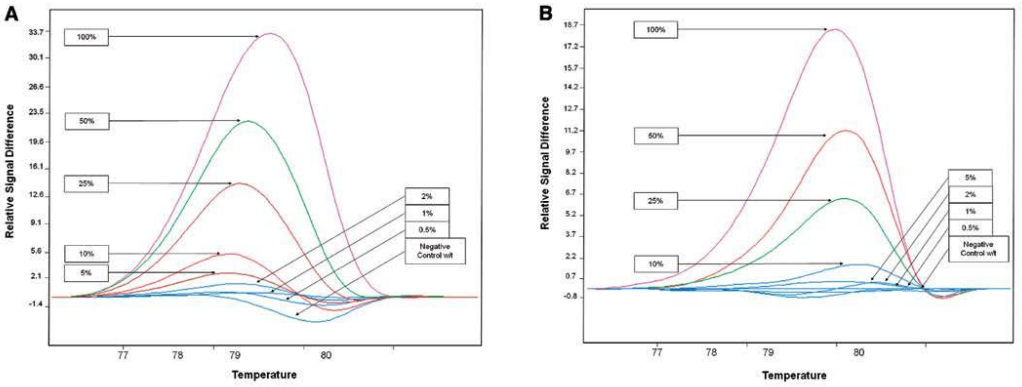


Figure 2. Sensitivity results for (A) exon 9 and (B) exon 20 mutations using PCR-HRM.

reported a decrease in survival in *PIK3CA* exon 20-mutated and HER2-positive patients. This study was retrospective and was based on a small number of cases (only 6 patients in the exon 20-mutated *PIK3CA* and HER2-positive group) and was never confirmed prospectively. Finally, in a larger series of patients, Cizkova *et al* (28) did not find any difference between exon 9- and exon 20-mutated tumors regarding metastasis-free survival. Using immunohistochemistry, Aleskandarany *et al* (29) reported that PIK3CA protein expression in invasive breast cancer was associated with poor prognosis.

The frequencies of *PIK3CA* mutations reported here, with PCR-HRM and PCR-ARMS, respectively, are fully consistent with COSMIC database values and previously published results reporting 18-40% of *PIK3CA* mutations in breast tumors (7,26,30-33).

In the present series, with a relatively limited number of cases, no significant correlation was observed between *PIK3CA* mutations and several clinical and histopathological criteria. Concerning the age at diagnosis, a higher *PIK3CA* mutation rate was noted in older patients (34) that was not observed in other series (25,26,28). The same is true for the histological type of breast cancer, when comparing ductal and lobular types. Some studies reported *PIK3CA* mutations to be more frequently observed in ductal than in lobular carcinomas (25,28,34) while others did not (35).

Although it has been reported that *PIK3CA* mutations are related to hormone receptor and HER2 status (28,34), this issue still remains controversial since no correlation between *PIK3CA* mutations and hormonal status has been observed (25,36,37) similarly to the results of the present study, or limited to estrogen receptor status, but not to progesterone receptor status (35). Similar findings have been found concerning the correlation between *PIK3CA* mutations and HER2 status (28,34) but again are controversial in other series (25,35) or observed when HER2 is determined using immunohistochemistry but not FISH (37). A higher frequency of *PIK3CA* mutation has also been noted in low SBR grade tumors similarly to the observation in the present series and consistently with other studies (28,34) but contrary with others (35).

All these discrepancies among the different studies could probably be explained by the relatively limited number of cases that were analyzed and the different techniques that were used for *PIK3CA* mutation analysis with different sensitivity limits. This also probably explains why a large range of mutation rates were reported. This point clearly justifies that consideration should be given to the validation and especially the endpoints and sensitivity limits of the assays that are routinely used.

Combining PCR-HRM and PCR-ARMS assays, several discrepancies were observed between the two techniques in 6 (5.9%) samples. All were identified as *PIK3CA* wild-type using PCR-ARMS and mutated using PCR-HRM; 5 samples with mutations on exon 9 and 1 sample with mutation on exon 20. Because our PCR-ARMS assay was designed to specifically, but only, identify the four main *PIK3CA* mutations (c.1624G→A, c.1633G→A, c.3140A→G and c.3140A→T), it is obvious that the 6 discordant cases should bear other mutations on exon 9 or 20, that were only detected using PCR-HRM which is an exon-specific method, able to detect all the somatic mutations on the entire exon 9 and 20. Exon 9 and 20 mutations, not located in the four main hotspots, were reported to represent approximately 10% of all exon 9 and 20 mutations in breast cancers (28). Our data were consistent with these values. In the present series, this rate of *PIK3CA* mutations, differing from the four main mutations identified by PCR-ARMS was found to be consistent with data recently reported in breast cancer (28).

Direct Sanger sequencing of these samples could confirm the hypothesis that they may carry another mutation but the lack of sensitivity of Sanger sequencing (approximately 20% mutant DNA) could be not discriminatory between a false-positive with HRM or a false-negative with sequencing (38).

The PCR-HRM and PCR-ARMS assays used here are highly sensitive, able to detect as low as 5% of mutated DNA for exon 9 (2.0 ng) and 10% for exon 20 (4.0 ng) and 0.5% (0.8 ng) of mutated DNA. The PCR-ARMS assay is more sensitive than pyrosequencing-based assay as previously described (38) and which was able to detect 5% of mutated DNA and even higher than another PCR-ARMS assay as previously reported (5 ng) (23). This high sensitivity could be explained by the high specificity of the primers used for this technique.

High sensitivity assays are required for routine analysis of mutations in clinical specimens. Recent results (39) achieved in colon cancer using *KRAS* mutation analysis, reported that sequencing was not sensitive enough to provide clinically relevant results yielding two many false-negative results. The authors recommended the use of more sensitive techniques with a detection limit approximating 1-2% to overcome this problem.

In conclusion, the present study highlighted the potential of PCR-HRM- and PCR-ARMS-based assays for the evaluation of the *PIK3CA* mutation status in breast cancers. No correlation was observed with patient age at diagnosis, histological type, hormone receptor and HER2 status. *PIK3CA* exon 9 and 20 mutations were found to be related to Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grade with a lower rate of mutations and a higher frequency of exon 9 mutations in SBRI and exon 20 mutations in SBRII/III tumors. No difference was observed in the frequency of the two different mutations screened for each exon in any subcategory. Thus, we propose to use a combination of both assays, with a screening of full exon 9 and 20 using PCR-HRM and further identification of the four main mutations using PCR-ARMS. Following analysis of our data, using such a procedure would have led to only one false-negative result (<1%) which is quite satisfactory. Combining these two assays should represent a cost-effective rapid procedure that provides highly reliable results that are fully consistent with the attempts of practitioners in view of personalizing therapy for invasive breast cancers.

Acknowledgements

The authors are grateful to the French 'Ligue contre le Cancer, Comités Lorrains' for supporting this study.

References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E and Forman D: Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 61: 69-90, 2011.
2. Engelman JA, Luo J and Cantley LC: The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. Nat Rev Genet 7: 606-619, 2006.

3. Tokunaga E, Oki E, Egashira A, *et al*: Deregulation of the Akt pathway in human cancer. Curr Cancer Drug Targets 8: 27-36, 2008.
4. McAuliffe PF, Meric-Bernstam F, Mills GB and Gonzalez-Angulo AM: Deciphering the role of PI3K/Akt/mTOR pathway in breast cancer biology and pathogenesis. Clin Breast Cancer 10: S59-S65, 2010.
5. Wang L, Zhang Q, Zhang J, *et al*: PI3K pathway activation results in low efficacy of both trastuzumab and lapatinib. BMC Cancer 11: 248, 2011.
6. Jiang BH and Liu LZ: PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. Adv Cancer Res 102: 19-65, 2009.
7. Bachman KE, Argani P, Samuels Y, *et al*: The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. Cancer Biol Ther 3: 772-775, 2004.
8. Karakas B, Bachman KE and Park BH: Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. Br J Cancer 94: 455-459, 2006.
9. Dunlap J, Le C, Shukla A, *et al*: Phosphatidylinositol-3-kinase and AKT1 mutations occur early in breast carcinoma. Breast Cancer Res Treat 120: 409-418, 2009.
10. Orlando L, Schiavone P, Fedele P, *et al*: Molecularly targeted endocrine therapies for breast cancer. Cancer Treat Rev 36: S67-S71, 2010.
11. Miller TW, Balko JM and Arteaga CL: Phosphatidylinositol 3-kinase and antiestrogen resistance in breast cancer. J Clin Oncol 29: 4452-4461, 2011.
12. Abramson V and Arteaga CL: New strategies in HER2-overexpressing breast cancer: many combinations of targeted drugs available. Clin Cancer Res 17: 952-958, 2011.
13. Ma CX, Crowder RJ and Ellis MJ: Importance of PI3-kinase pathway in response/resistance to aromatase inhibitors. Steroids 76: 750-752, 2011.
14. Razis E, Bobos M, Kotoula V, *et al*: Evaluation of the association of PIK3CA mutations and PTEN loss with efficacy of trastuzumab therapy in metastatic breast cancer. Breast 128: 447-456, 2011.
15. Dave B, Migliaccio I, Gutierrez MC, *et al*: Loss of phosphatase and tensin homolog or phosphoinositol-3 kinase activation and response to trastuzumab or lapatinib in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing locally advanced breast cancers. J Clin Oncol 29: 166-173, 2011.
16. Esteva FJ, Guo H, Zhang S, *et al*: PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. Am J Pathol 177: 1647-1656, 2010.
17. Baselga J: Treatment of HER2-overexpressing breast cancer. Ann Oncol 21: vii36-40, 2011.
18. Garrett JT and Arteaga CL: Resistance to HER2-directed antibodies and tyrosine kinase inhibitors: mechanisms and clinical implications. Cancer Biol Ther 11: 793-800, 2011.
19. Tanaka H, Yoshida M, Tanimura H, *et al*: The selective class I PI3K inhibitor CH5132799 targets human cancers harboring oncogenic PIK3CA mutations. Clin Cancer Res 17: 3272-3281, 2011.
20. Dan S, Okamura M, Mukai Y, *et al*: ZSTK474, a specific phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, induces G1 arrest of the cell cycle in vivo. Eur J Cancer 48: 936-943, 2012.
21. Bibeau F, Frugier H, Denouel A, Sabourin JC and Boissiere-Michot F: Technical considerations for KRAS testing in colorectal cancer. The pathologist's point of view. Bull Cancer 96: S15-S22, 2009 (In French).
22. Vorkas PA, Poumpouridou N, Agelaki S, Kroupis C, Georgoulias V and Lianidou ES: PIK3CA hotspot mutation scanning by a novel and highly sensitive high-resolution small amplicon melting analysis method. J Mol Diagn 12: 697-704, 2010.
23. Board RE, Thelwell NJ, Ravetto PF, *et al*: Multiplexed assays for detection of mutations in PIK3CA. Clin Chem 54: 757-760, 2008.
24. Dumont AG, Dumont SN and Trent JC: The favorable impact of PIK3CA mutations on survival: an analysis of 2587 patients with breast cancer. Chin J Cancer 31: 327-334, 2012.
25. Barbareschi M, Buttitta F, Felicioni L, *et al*: Different prognostic roles of mutations in the helical and kinase domains of the PIK3CA gene in breast carcinomas. Clin Cancer Res 13: 6064-6069, 2007.
26. Lai YL, Mau BL, Cheng WH, Chen HM, Chiu HH and Tzen CY: PIK3CA exon 20 mutation is independently associated with a poor prognosis in breast cancer patients. Ann Surg Oncol 15: 1064-1069, 2008.
27. Lerma E, Catasus L, Gallardo A, *et al*: Exon 20 PIK3CA mutations decrease survival in aggressive (HER-2 positive) breast carcinomas. Virchows Arch 453: 133-139, 2008.
28. Cizkova M, Susini A, Vacher S, *et al*: PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ERalpha, PR and ERBB2-based subgroups. Breast Cancer Res 14: R28, 2012.
29. Aleskandarany MA, Rakha EA, Ahmed MA, *et al*: PIK3CA expression in invasive breast cancer: a biomarker of poor prognosis. Breast Cancer Res Treat 122: 45-53, 2009.
30. Campbell IG, Russell SE, Choong DY, *et al*: Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. Cancer Res 64: 7678-7681, 2004.
31. Levine DA, Bogomolniy F, Yee CJ, *et al*: Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers. Clin Cancer Res 11: 2875-2878, 2005.
32. Miron A, Varadi M, Carrasco D, *et al*: PIK3CA mutations in in situ and invasive breast carcinomas. Cancer Res 70: 5674-5678, 2010.
33. Wu G, Xing M, Mambo E, *et al*: Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. Breast Cancer Res 7: R609-R616, 2005.
34. Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, *et al*: PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. Clin Cancer Res 15: 5049-5059, 2009.
35. Maruyama N, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Monden M and Noguchi S: Clinicopathologic analysis of breast cancers with PIK3CA mutations in Japanese women. Clin Cancer Res 13: 408-414, 2007.
36. Ellis MJ, Lin L, Crowder R, *et al*: Phosphatidyl-inositol-3-kinase alpha catalytic subunit mutation and response to neoadjuvant endocrine therapy for estrogen receptor positive breast cancer. Breast Cancer Res Treat 119: 379-390, 2010.
37. Perez-Tenorio G, Alkhori L, Olsson B, *et al*: PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. Clin Cancer Res 13: 3577-3584, 2007.
38. Baker CL, Vaughn CP and Samowitz WS: A PIK3CA pyrosequencing-based assay that excludes pseudogene interference. J Mol Diagn 14: 56-60, 2012.
39. Tougeron D, Lecomte T, Pages JC, *et al*: Effect of low-frequency KRAS mutations on the response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 30: 3520, 2012.

Chapitre III

Importance de la validation selon la norme ISO 15189 pour le passage de la recherche à la routine diagnostique

III. Importance de la validation selon la norme ISO 15 189 pour le passage de la recherche à la routine diagnostique

Le passage de la démarche expérimentale à la routine est souvent très rapide dans les plateformes de génétique moléculaire. En effet, il y a une volonté de l'INCa, *via* le financement de la recherche de biomarqueurs émergents, de réduire au maximum la durée entre développement expérimental et passage en routine des examens de biologie moléculaire afin de faire bénéficier des innovations thérapeutiques aux patients le plus rapidement possible. D'autre part, depuis la loi du 16 Janvier 2010 relative à l'organisation des soins en France, l'accréditation des laboratoires de biologie médicale est rendue obligatoire selon la norme ISO 15 189. Le génotypage est un acte de biologie médicale induisant un choix important au niveau clinique, puisqu'il guide la prescription de médicaments anticancéreux pas les oncologues. Par conséquent les laboratoires réalisant ce type d'analyse de biologie moléculaire à visée théranostique doivent appliquer la loi et répondre aux exigences de la norme ISO 15 189 pour obtenir leur accréditation.

C'est dans ce cadre que deux études ont été publiées. Ces deux articles décrivent l'adaptation des référentiels émis par le COFRAC ainsi que la méthodologie appliquée pour la validation de techniques de biologie moléculaire, à savoir l'extraction et le dosage des acides nucléiques extraits de fragments tumoraux fixés au formol et inclus en paraffine et la recherche de mutation du gène *KRAS* par méthode de PCR TaqMan. Ce chapitre correspond au deuxième objectif de ce travail, préalable lui aussi à l'assurance de résultats de qualité pour la partie suivante plus expérimentale.

III.1. Validation de méthode selon la norme ISO 15189 et le SH GTA 04 : Application à l'extraction et au dosage quantitatif de l'ADN par méthode spectrophotométrique

La réalisation d'un génotypage requiert l'extraction de l'ADN tumoral. Dans la quasi totalité des cas, les échantillons utilisés pour la détermination du statut mutationnel sont des fragments de tumeurs fixées au formol et incluses en paraffine. La standardisation et la qualité de cette étape faisant partie du processus pré-analytique est critique pour le reste de la chaine analytique. C'est dans ce contexte que nous avons publié en 2013 un article décrivant la validation des méthodes d'extraction et de dosage de l'ADN tumoral (Harlé A., Lion M., Husson M., Dubois C., Merlin J.L. Validation de méthode selon la norme ISO 15189 et le SH GTA 04 : Application à l'extraction et au dosage quantitatif de l'ADN par méthode spectrophotométrique. *Annales de Biologie Clinique. 2013 Oct 1;71(5):608-614*). Cet article décrit la méthodologie appliquée pour la validation de nos techniques et comment nous avons adapté les référentiels du COFRAC pour les approprier à ces techniques très éloignées de la biologie médicale standard et ainsi répondre aux exigences de la norme ISO 15 189

Introduction

L'accréditation des laboratoires de biologie médicale (LBM) selon la norme ISO 15 189 est rendue obligatoire depuis la loi du 16 Janvier 2010. Ainsi, c'est une obligation réglementaire pour les LBM d'être accrédités pour au moins 50% de leur activité avant fin Octobre 2016. L'extraction de l'ADN des tissus fixés au formol et inclus en paraffine est une étape critique pour les examens de génétique somatique. En effet, il est important de pouvoir extraire de manière fiable l'ADN tumoral contenu dans des prélèvements parfois de mauvaise qualité. La fixation au formol, voire à d'autres fixateurs comme l'AFA (acide acétique, Formol, alcool) réduit considérablement la qualité des ADN, aussi il est

important de pouvoir l'extraire de manière correcte. D'autre part, le dosage par spectrophotométrie permet de s'assurer que la quantité d'ADN contenue dans l'échantillon est suffisante pour un génotypage.

Matériel & Méthode

Nous avons procédé à la validation de méthode d'extraction d'ADN à partir d'échantillons de tissus fixés au formol et inclus en paraffine, et de dosage par spectrophotométrie (NanoVue). Les dossiers de validation ont été réalisés en tenant compte de la méthodologie du COFRAC (SH GTA 04 et SH FORM 43 et 44), mais de nombreuses adaptations ont été nécessaires pour tenir compte des spécificités des examens et de la rareté des échantillons.

Résultats

La mise en œuvre de cette validation de méthode a permis de valider l'extraction de l'ADN en utilisant une technique manuelle d'extraction sur colonne pour les tissus fixés au formol et inclus en paraffine. La validation du dosage a permis de déterminer tous les paramètres nécessaires (limite de détection, limite de quantification, répétabilité, reproductibilité, etc...).

Conclusion

La validation de méthode est une condition nécessaire pour rendre le résultat d'un examen sous accréditation. Les étapes qui précèdent le génotypage sont critiques compte tenu de la nature des échantillons utilisés. Il apparait donc nécessaire de s'assurer de la fiabilité des examens mis en œuvre avant le génotypage. La validation de l'extraction et du dosage selon les recommandations du

COFRAC est ainsi une preuve supplémentaire de la fiabilité des résultats obtenus lors des examens effectués sur l'ADN extrait des tissus fixés et inclus en paraffine.

Qualité-Accréditation

ANNALES DE BIOLOGIE CLINIQUE

Ann Biol Clin 2013 ; 71 (5) : 608-14

Validation de méthode selon la norme ISO 15189 et le SH GTA 04 : application à l'extraction et au dosage quantitatif de l'ADN par méthode spectrophotométrique

Method validation according to ISO 15189 and SH GTA 04: application for the extraction of DNA and its quantitative evaluation by a spectrophotometric assay

Alexandre Harlé[1,2,3]
Maëva Lion[1,2,3]
Marie Husson[1]
Cindy Dubois[1]
Jean-Louis Merlin[1,2,3]

[1] Service de biopathologie, Institut de cancérologie de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

[2] CNRS, UMR 7039 CRAN, Nancy, France

[3] Université de Lorraine, Nancy, France
<a.harle@nancy.unicancer.fr>

Résumé. Selon la législation relative à la biologie médicale du 16 janvier 2010, tous les laboratoires de biologie médicale doivent être accrédités selon la norme ISO 15189 pour au moins 50 % de leur activité avant fin 2016. Une des étapes critique en biologie moléculaire et plus précisément en génétique aussi bien somatique que constitutionnelle, consiste en l'extraction de l'ADN depuis un échantillon d'intérêt, qu'il soit solide ou liquide. L'ADN extrait doit ensuite répondre à un certain nombre de critères de qualité et également être en concentration suffisante pour permettre la réalisation des examens de biologie moléculaire comme la détection de mutations somatiques par exemple. Cet article décrit, à titre d'exemple, la validation de l'extraction et de la purification d'ADN par méthode d'extraction sur colonne, puis de son dosage quantitatif par méthode spectrophotométrique, selon la norme ISO 15189 et le guide technique d'accréditation de santé humaine du Cofrac SH-GTA-04.

Mots clés : *accréditation, ISO, extraction, ADN*

Abstract. According to the French legislation on medical biology (January 16th, 2010), all biological laboratories must be accredited according to ISO 15189 for at least 50% of their activities before the end of 2016. The extraction of DNA from a sample of interest, whether solid or liquid is one of the critical steps in molecular biology and specifically in somatic or constitutional genetic. The extracted DNA must meet a number of criteria such quality and also be in sufficient concentration to allow molecular biology assays such as the detection of somatic mutations. This paper describes the validation of the extraction and purification of DNA using chromatographic column extraction and quantitative determination by spectrophotometric assay, according to ISO 15189 and the accreditation technical guide in Human Health SH-GTA-04.

Key words: *certification, DNA, ISO 15189, extraction*

Article reçu le 2 mai 2012,
accepté le 28 juin 2012

Selon la législation relative à la biologie médicale du 16 janvier 2010, tous les laboratoires de biologie médicale (LBM) doivent être accrédités selon la norme ISO 15189 [1, 2]. Il est ainsi demandé aux LBM d'avoir au moins 50 % de leurs examens accrédités avant fin 2016, 70 % avant fin 2018 et 100 % avant fin 2020.

Selon le document « portées types d'accréditation – SH INF 50 » [3] édité par le Comité français d'accréditation (Cofrac) les examens de biologie moléculaire font partie intégrante de la biologie médicale et sont également concernés par ces obligations réglementaires s'ils figurent à la nomenclature.

Une des étapes critiques en biologie moléculaire et plus précisément en génétique, aussi bien somatique que constitutionnelle, consiste en l'extraction de l'ADN depuis un

Tirés à part : A. Harlé

Pour citer cet article : Harlé A, Lion M, Husson M, Dubois C, Merlin JL. Validation de méthode selon la norme ISO 15189 et le SH GTA 04 : application à l'extraction et au dosage quantitatif de l'ADN par méthode spectrophotométrique. *Ann Biol Clin* 2013 ; 71(5) : 608-14 doi:10.1684/abc.2013.0891

doi:10.1684/abc.2013.0891

© John Libbey Eurotext, 2013

Tiré à part auteur

échantillon d'intérêt, qu'il soit solide ou liquide. L'ADN extrait doit ensuite répondre à un certain nombre de critères de qualité et également être en concentration suffisante pour permettre la réalisation des examens de biologie moléculaire comme la détection de mutations somatiques par exemple.

L'extraction et le dosage s'intègrent dans la phase préanalytique du processus d'analyse de l'ADN et sont considérés comme critiques, compte tenu de leur haute importance pour la réalisation et la fiabilité des étapes analytiques ultérieures.

Cet article décrit, à titre d'exemple, la validation de l'extraction et de la purification d'ADN par méthode d'extraction sur colonne, puis de son dosage quantitatif par méthode spectrophotométrique selon la norme ISO 15189 et le guide technique d'accréditation de santé humaine du Cofrac SH-GTA-04.

Pour la validation de cette méthode, nous avons séparé la phase d'extraction et la phase de dosage. En effet, l'extraction étant effectuée à partir de kits portant le marquage CE-IVD, donc validés par le fabricant, elle est classée comme une méthode de portée A par le Cofrac et ne nécessite qu'une simple vérification. La méthode de dosage spectrophotométrique n'a par contre pas été validée par le fabricant et par conséquent est classée en portée B, nécessitant ainsi une validation complète.

Méthode

Nous avons suivi la méthodologie décrite par le Cofrac dans le SH GTA 04 (Révision 0 – avril 2011) [4] pour le design du plan expérimental nécessaire à la validation de méthode. Certaines recommandations ont dû être adaptées à la biologie moléculaire.

Pour la méthode d'extraction, reconnue de portée A, nous avons évalué la contamination, la répétabilité, la fidélité intermédiaire puis comparé la méthode avec une autre méthode d'extraction reposant sur le même principe. Cette méthode, validée pour le diagnostic *in vitro* (CE-IVD), utilise les kits d'extraction Cobas® Roche DNA kits (Roche Diagnostics, Meylan, France). Les échantillons primaires utilisés pour cette évaluation sont des échantillons de tissus tumoraux fixés au formol et inclus en paraffine.

La méthode de dosage est basée sur une mesure spectrophotométrique de l'absorbance à 260 et 280 nm à partir d'un faible volume d'échantillon (1 à 2 µL) sur un trajet optique de l'ordre du millimètre (NanoVue Plus™, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Royaume-Uni) (*figure 1*). Cette méthode quantitative est considérée comme de portée B selon les critères du Cofrac et nécessite donc l'étude de la répétabilité, de la fidélité intermédiaire, la justesse, l'exactitude, les incertitudes de mesure, l'intervalle de mesure, l'étude des contaminations et la robustesse.

Résultats

Vérification de la méthode d'extraction

Évaluation des sources de contamination

Nous avons évalué l'absence de contamination au cours de la manipulation d'extraction en procédant, au cours d'une série classique, en une extraction sur un échantillon dit « vierge ». Cet échantillon vierge est constitué uniquement de paraffine et ne contient pas de tissu, donc en théorie pas d'ADN. Après extraction de cet échantillon vierge, il appa-

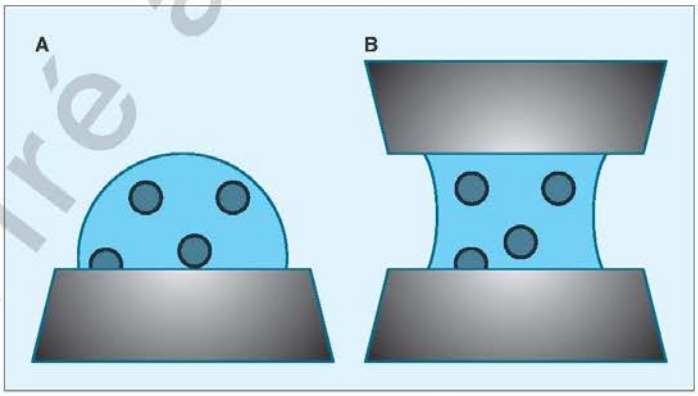


Figure 1. Dosage de l'ADN extrait par système spectrophotométrique NanoVue™. Un échantillon de faible volume (2 µL) est déposé sur la plaque de lecture **(A)** puis le bras de lecture est abaissé pour procéder à la mesure **(B)**. Le trajet optique est de l'ordre du millimètre.

© John Libbey Eurotext, 2013

Tiré à part auteur

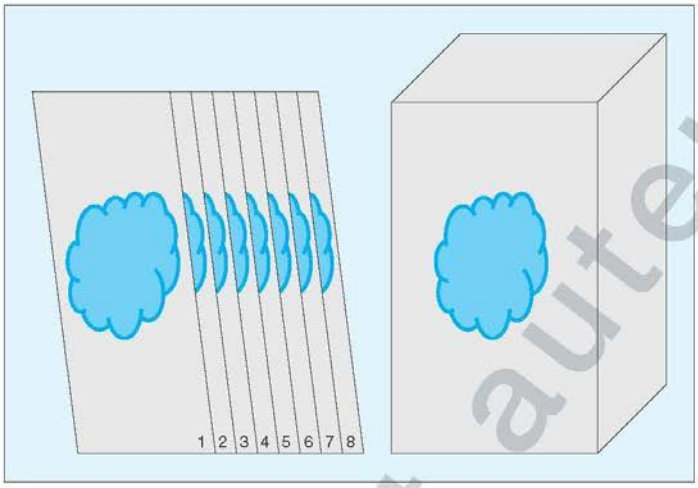


Figure 2. Huit coupes successives de 5 µm sont réalisées au microtome à partir d'un bloc de paraffine contenant de la tumeur fixée au formol. Les 8 coupes sont considérées comme identiques compte tenu de leur proximité dans l'espace.

raît que seul du solvant d'extraction est récupéré. Ainsi, en effectuant une mesure en spectrophotométrie, puis une analyse par PCR sur le produit obtenu, il apparaît qu'aucune contamination inter-échantillons n'est présente lors de la méthode, mais également que les conditions expérimentales utilisées sont en accord avec une absence de contamination au niveau du matériel et que les procédures internes utilisées garantissent l'absence de contamination.

Évaluation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire

L'extraction étant effectuée sur du tissu tumoral inclus en paraffine, nous avons, pour l'étude de la répétabilité et de la reproductibilité, utilisé 8 coupes successives de 5 µm d'un même bloc tumoral (*figure 2*). Ainsi, toutes les coupes utilisées sont considérées comme homogènes et comparables, puisqu'il existe un espace de moins de 40 µm entre la première et la dernière coupe. Cinq coupes (coupes n° 1, 2, 5, 7 et 8) ont été analysées le même jour par le même opérateur en utilisant le même protocole. La quantité d'ADN extrait a été évaluée par dosage spectrophotométrique puis sa qualité a été évaluée en utilisant une amplification par PCR (test de 7 mutations du gène *KRAS* en PCR TaqMan). Les 5 dosages montrent que la quantité d'ADN extraite est équivalente pour chaque échantillon (n = 5, m = 19,8 ng/µL, s = 2,18 ng/µL, CV = 10,9 % - *tableau 1*). De même, les tests d'amplification pour le gène *KRAS* en utilisant 7 sondes spécifiques différentes, n'ont pas mis en évidence de différence dans le nombre de

Tableau 1. Étude de la répétabilité de la méthode d'extraction. Cinq coupes de 5 µm ont été utilisées pour l'extraction de l'ADN, puis 2 mesures de la concentration ont été effectuées.

Échantillon	Concentration mesurée C_1 (ng/µL)	Concentration mesurée C_2 (ng/µL)
Lame 1	24,0	23,0
Lame 2	19,0	20,0
Lame 5	18,5	17,5
Lame 7	20,5	19,0
Lame 8	18,5	18,0

m = 19,8 ng/µL ; s = 2,149 ng/µL ; CV = 10,9 %.

Cp mesurés (CV inférieur à 2 %, *tableau 2*). Ainsi, nous considérons que cette méthode d'extraction est répétable.
L'évaluation de la fidélité intermédiaire a été effectuée en utilisant les coupes n° 3, 4 et 6 selon le même protocole, mais par des opérateurs différents et à une semaine d'intervalle (les coupes ont été conservées à + 5 °C +/- 3 °C pendant toute la durée de l'expérimentation). Les dosages n'ont pas mis en évidence de différence significative (biais moyens inférieur à 10 %) et les PCR n'ont démontré aucune altération sur la qualité de l'amplification de l'ADN extrait (biais inférieur à 5 %) (*tableau 3*). Ainsi, nous pouvons considérer que notre méthode d'extraction bénéficie d'une fidélité intermédiaire satisfaisante.

Comparaison avec une méthode équivalente

Le kit utilisé pour l'extraction a été comparé avec un autre kit du commerce (FFPET tissue DNA kit, Qiagen, Cour-

© John Libbey Eurotext, 2013

Pour la part auteur

Tableau 2. Évaluation de la répétabilité de l'extraction : qualité de l'ADN extrait évaluée par amplification sur 7 mutations du gène *KRAS* fréquemment rencontrées dans les cancers colorectaux métastatiques.

	Cp moyen par type de mutation du gène *KRAS*						
Échantillon	**G12S**	**G12R**	**G12C**	**G12D**	**G12A**	**G12V**	**G13D**
Lame 1	25,11	26,65	25,93	27,59	26,57	26,01	26,66
Lame 2	24,50	26,13	25,09	27,62	26,48	26,12	26,55
Lame 5	25,63	26,78	26,66	28,39	27,37	26,77	27,47
Lame 7	24,63	26,46	25,60	27,10	26,58	25,86	26,92
Lame 8	24,68	26,68	24,87	27,43	26,40	25,62	26,38
Moyenne	24,91	26,54	25,63	27,62	26,68	26,08	26,80
Écart type	0,47	0,26	0,71	0,48	0,40	0,43	0,42
CV	1,87 %	0,97 %	2,76 %	1,72 %	1,48 %	1,65 %	1,58 %

Tableau 3. Évaluation de la fidélité intermédiaire : qualité de l'ADN extrait évaluée par amplification sur 7 mutations du gène *KRAS* fréquemment rencontrées dans les cancers colorectaux métastatiques.

	Cp moyen par type de mutation du gène *KRAS*						
	G12S	**G12R**	**G12C**	**G12D**	**G12A**	**G12V**	**G13D**
Lame 3	24,66	26,68	25,45	28,18	30,07	27,29	25,54
Lame 4	25,63	27,02	26,45	28,49	27,47	27,20	27,32
Lame 6	24,86	27,04	25,40	28,58	26,58	26,22	26,59
Moyenne	25,05	26,91	25,77	28,42	28,04	26,90	26,48
Écart type	0,52	0,20	0,59	0,21	1,82	0,59	0,90
CV (%)	2,06 %	0,74 %	2,30 %	0,74 %	6,47 %	2,20 %	3,39 %
Biais moyen (%)	1,38 %	1,41 %	1,60 %	2,86 %	5,34 %	3,17 %	2,48 %

Tableau 4. Résultats de l'évaluation de la fidélité intermédiaire pour le dosage d'ADN par méthode spectrophotométrique.

	Concentration théorique (ng/µL)	**Moyenne (ng/µL)**	**Écart type (ng/µL)**	**CV**
Échantillon Niveau 1	15,00	15,18	1,1502	7,58 %
Échantillon Niveau 2	60,00	62,86	1,1858	1,89 %
Échantillon Niveau 3	120,00	119,36	3,8987	3,27 %
Échantillon Niveau 4	200,00	204,06	5,1646	2,53 %
Échantillon Niveau 5	400,00	406,67	3,5230	0,87 %

taboeuf, France). Quarante échantillons ont été extraits en parallèle avec les deux méthodes [5]. L'étude des concentrations d'ADN obtenues et l'étude de la qualité de l'amplification n'ont pas montré de différence significative entre les deux méthodes d'extraction.

Validation de la méthode de dosage

Étude de la répétabilité

Trente mesures de deux échantillons de concentrations fixées ($c_1 = 15{,}0$ ng/µL et $c_2 = 90$ ng/µL) ont été réalisées le même jour par le même opérateur. La méthode est répétable ($n_1 = 30$; $m_1 = 15{,}93$ ng/µL ; $s_1 = 0{,}885$ ng/µL ; $CV_1 = 5{,}55$ % / $n_2 = 30$; $m_2 = 89{,}98$ ng/µL ; $s_2 = 1{,}171$ ng/µL ; $CV_2 = 1{,}30$ %).

Étude de la fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire a été étudiée en faisant réaliser à 3 jours différents espacés d'une semaine, par 3 opérateurs différents, la mesure à 6 reprises de 5 échantillons c_1, c_2, c_3, c_4 et c_5 de concentrations connues 15,0, 60,0, 120,0, 200,0 et 400,0 ng/µL respectivement. La méthode est considérée reproductible (CV < 8 % ; *tableau 4*).

Approche de la justesse et exactitude

L'approche de la justesse a été effectuée en analysant 4 échantillons de contrôles internes de qualité préparés au laboratoire, CI_1, CI_2, CI_3 et CI_4 de concentrations théoriques respectives 30,0, 90,0, 150,0 et 300,0 ng/µL. Chaque échantillon a été mesuré 3 fois puis le biais a été calculé par rapport à chaque concentration cible (*tableau 5*). Le biais

© John Libbey Eurotext, 2013

Tirés à part auteur

Tableau 5. Résultats obtenus pour l'approche de la justesse.

Échantillon	Concentration théorique (ng/µL)	Concentration mesurée (ng/µL)	Biais
CI_1 - 1	30,00	32,99	9,98 %
CI_1 - 2	30,00	28,62	4,60 %
CI_1 - 3	30,00	31,54	5,12 %
CI_2 - 4	90,00	91,77	1,97 %
CI_2 - 5	90,00	88,86	1,27 %
CI_2 - 6	90,00	90,32	0,35 %
CI_3 - 7	150,00	152,98	1,99 %
CI_3 - 8	150,00	158,33	5,55 %
CI_3 - 9	150,00	154,44	2,96 %
CI_4 - 10	300,00	303,09	1,03 %
CI_4 - 11	300,00	301,64	0,55 %
CI_4 - 12	300,00	299,21	0,26 %

étant inférieur au seuil de 10 % que nous nous étions fixés, nous considérons notre méthode comme juste.
Il est important de préciser que l'estimation de l'exactitude n'a pas pu être mesurée, car à notre connaissance, aucun contrôle interne de qualité certifié n'est commercialisé à ce jour.

Incertitudes de mesure

Nous avons adopté une méthode dite « intra laboratoire » et suivi les recommandations décrites dans le SH GTA 14 du Cofrac [6]. Ce calcul fait intervenir la mesure de 5 échantillons de concentrations connues ainsi que les incertitudes connues sur le matériel utilisé. L'incertitude maximale mesurée est de 4,10 ng/µL.

Intervalle de mesure

La limite de détection (LOD) a été évaluée en mesurant à 31 reprises un échantillon blanc. La limite de quantification (LOQ) quant à elle, a été déterminée en dosant des échantillons obtenus par dilutions successives d'un échantillon de concentration connue. Pour chacune des dilutions, le coefficient de variation a été calculé, puis la limite de quantification est déterminée graphiquement avec un seuil CV = 10 % en traçant la courbe CV = f (dilutions) (*figure 3*).
Nous avons ainsi déterminé une LOD et une LOQ de 3,22 ng/µL et 7,0 ng/µL respectivement.
La linéarité annoncée par le constructeur est de 1 à 15 000 ng/µL. Nous avons testé cette linéarité jusqu'à 500 ng/µL, ce qui correspond à une valeur maximale qui n'a encore jamais été rencontrée dans notre pratique. L'étude de la linéarité nous a ainsi permis d'établir par régression linéaire, une linéarité de 1 à 500 ng/µL ($r^2 = 0{,}9987$; $y = 0{,}0206x + 0{,}0973$).

Étude des contaminations

Nous avons mesuré à 3 reprises successives un échantillon de très forte concentration (500 ng/µL) puis à 3 reprises

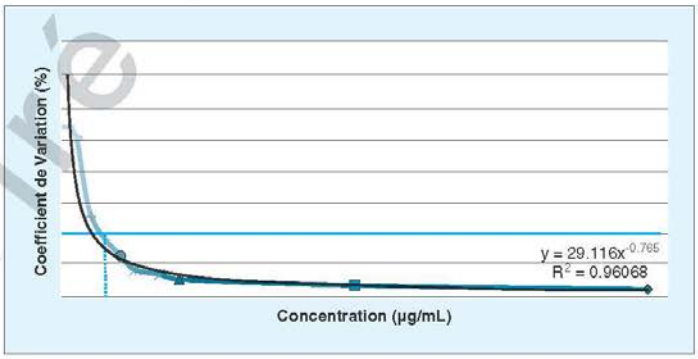


Figure 3. Calcul graphique de la limite de quantification (LOQ) en établissant la courbe CV = f (concentration théorique) puis lecture de la valeur de la concentration limite pour CV = 10 %.

© John Libbey Eurotext, 2013

Tiré à part auteur

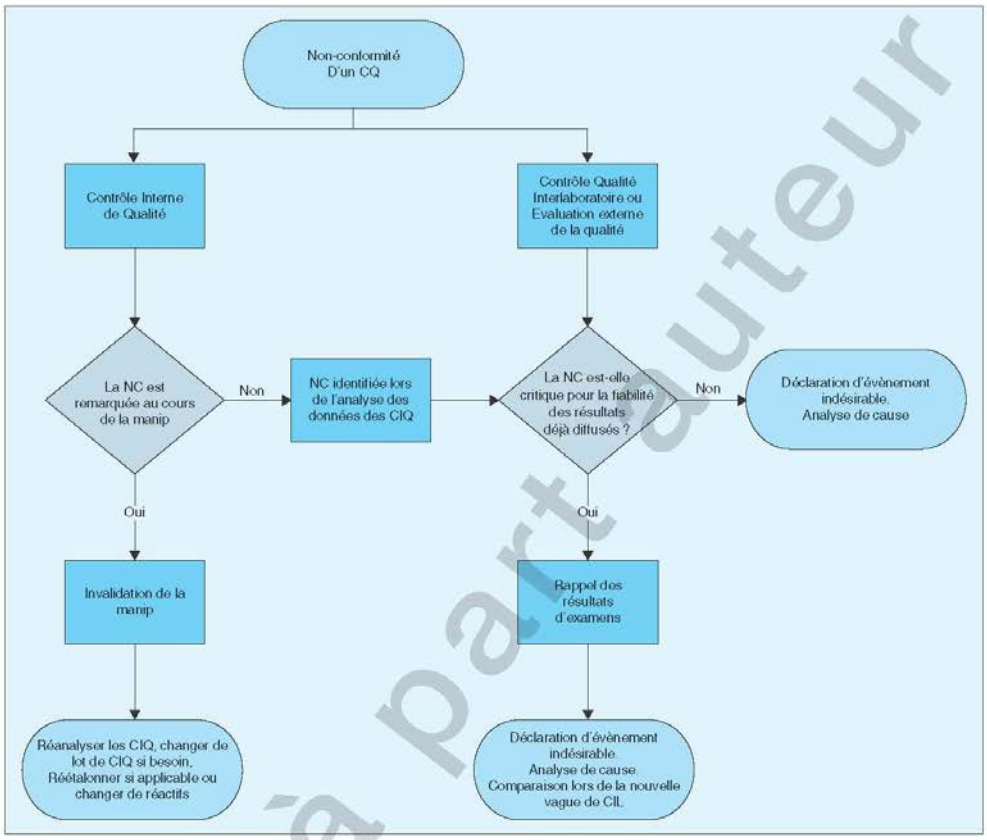


Figure 4. Exemple d'organisation en cas de survenue d'une non-conformité suite à un contrôle interne de la qualité (CIQ), d'un contrôle inter-laboratoire (CIL) ou d'une évaluation externe de la qualité (EEQ).

successives un échantillon de faible valeur (5 ng/µL). Le calcul de la contamination nous donne ainsi une valeur de - 0,46 %, ce qui est en accord avec une absence de contamination inter-échantillons lors des dosages en routine et qui également confirme l'absence d'effet mémoire.

Étude de la robustesse

Nous avons étudié l'impact du volume utilisé pour le dosage. Ainsi, il apparaît que les résultats obtenus restent fiables pour une prise d'essai comprise entre 1 et 2,5 ng/µL. Une prise d'essai inférieure à 1 µL ne permet pas d'obtenir une mesure fiable.

Discussion

Cet exemple de double validation (portée A pour l'extraction et portée B pour le dosage) peut être adapté pour toutes les méthodes quantitatives. Pour les méthodes de portée A, une vérification reste assez simple à mettre en œuvre, cependant, il est important de noter que la méthode n'est garantie par le fabricant que si le laboratoire utilise de manière stricte le protocole associé. Toute modification du protocole fabricant par le laboratoire devra faire l'objet d'une validation préalable ou de s'assurer auprès du fournisseur que cette modification du protocole n'a pas d'impact sur le résultat final obtenu. Pour la validation des méthodes

© John Libbey Eurotext, 2013

Tirés à part auteur

de portée B, il appartient à chaque laboratoire d'adapter la validation à l'examen concerné. Chaque dossier de validation peut et doit faire l'objet d'une amélioration continue. Chaque manipulation supplémentaire doit être enregistrée de manière stricte et conservée au sein du laboratoire. Il est important de signaler que le laboratoire doit fixer les limites qu'il s'autorise sur chaque paramètre de la validation. Selon le type de méthode analytique, on fixera ainsi une valeur limite pour les coefficients de variation ou les biais. Ces deux paramètres doivent être déterminés et fixés au préalable en étudiant l'impact éventuel de ces variations sur le processus post-analytique, et donc sur le résultat final. Il est enfin important de mentionner que chaque examen doit faire l'objet d'une évaluation régulière. Ainsi, il incombe aux laboratoires de s'assurer de la mise en place d'un programme de qualité [2], qu'il soit par le biais d'une évaluation interne (contrôle de qualité interne – CIQ) ou externe (participation à une évaluation externe de la qualité – EEQ ou à un contrôle inter-laboratoire de la qualité – CIL). Il n'existe pas à ce jour d'EEQ pour les méthodes d'extraction et de dosage de l'ADN, ce qui renforce l'importance et la responsabilité des laboratoires quant à la mise en place de CIQ ou de CIL. Certains laboratoires privés proposent des échantillons calibrés et certifiés dans le domaine de la biologie moléculaire, idéaux pour la mise en place de CIQ, mais ces échantillons restent encore assez onéreux. Les CIL sont plus simples à réaliser, mais ne permettent que de comparer des résultats finaux. En effet, en cas de discordance, en l'absence de laboratoire référent, il apparaît difficile de déterminer quel laboratoire est le plus proche de la valeur réelle pour un échantillon donné.
Selon la norme ISO 15189, le laboratoire doit avant même la mise en place de contrôles qualité, savoir quelle sera la fréquence, quels seront les critères de jugement ou d'acceptabilité, mais également la façon dont les résultats seront exploités et quelles seront les actions correctives à mettre en œuvre en cas de non-conformité. La *figure 4* présente un exemple de marche à suivre en cas de survenue d'une non-conformité au cours d'un CIQ, d'un CIL ou d'un EEQ.

Conclusion

Nous avons validé, selon les exigences du Cofrac, deux méthodes d'examen (extraction d'ADN, portée A et dosage d'ADN, portée B) qui ont, selon notre analyse de risques, un rôle critique sur les phases analytiques ultérieures en biologie moléculaire. Les données recueillies lors de la vérification ou de la validation ont été renseignées dans les formulaires prévus par le Cofrac, SH-FORM 43 et SH-FORM 44 [7, 8]. Chaque étape de vérification ou de validation doit être adaptée en fonction du type d'examen et de la criticité de chacune des étapes d'analyse et il appartient donc à chaque laboratoire de biologie médicale de procéder à une analyse de risques rigoureuse.

Liens d'intérêts : aucun.

Références

1. Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale, 2010, modifiée par la Loi 2013-442 du 30 mai 2013.

2. Norme ISO 15189. Afnor, 2012.

3. Portées types d'accréditation - SH INF 50 - Révision #00. Cofrac, 2011.

4. Guide technique d'accréditation de vérification (Portée A)/Validation (portée B) des méthodes en biologie médicale - SH GTA 04 - Révision #00. Cofrac, 2011.

5. Harlé A, Busser B, Rouyer M, Harter V, Genin P, Leroux A, *et al.* Comparison of Cobas 4800 KRAS, TaqMan PCR and high resolution melting PCR assays for the detection of KRAS somatic mutations in formalin-fixed paraffin embedded colorectal carcinomas. *Virchows Arch* 2013 ; 462 : 329-35.

6. Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale - SH GTA 14 - Révision #00. Cofrac, 2011.

7. Fiche type quantitatif - Vérification (portée A)/Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale - SH FORM 43 - Révision #00. Cofrac, 2011.

8. Fiche type qualitatif - Vérification (portée A)/Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale - SH FORM 44 - Révision #00. Cofrac, 2011.

Tirés à part auteur

© John Libbey Eurotext, 2013

III.2. Validation de méthode selon la norme ISO 15 189 et le SH-GTA-04, Application à la détection des mutations *KRAS* par méthode TaqMan

Afin de répondre aux exigences d'accréditation selon la norme ISO 15189, il était important de valider notre technique de PCR TaqMan utilisée pour le génotypage des codons 12 et 13 de *KRAS*. Cette méthode « maison » est dite de portée B par le COFRAC, car non validée au préalable par le fabricant. Aucune méthodologie de validation pour la PCR en temps réel n'a été publiée jusqu'à présent, c'est pourquoi il nous paraissait important de partager notre expérience avec d'autres laboratoires rencontrant les mêmes problématiques. Nous avons donc publié en 2013 un article décrivant la validation de cette méthode de PCR TaqMan afin de répondre aux exigences de la norme ISO 15 189 (**Harlé A.**, Dubois C., Rouyer M., Merlin J.L. Validation de méthode selon la norme ISO 15189 et le SH GTA 04 : Application à la détection des mutations *KRAS* par méthode TaqMan. *Annales de Biologie Clinique. 2013 Oct 1 ;71(5):603-607*).

Introduction

L'accréditation des laboratoires de biologie médicale (LBM) selon la norme ISO 15 189 est rendue obligatoire depuis la loi du 16 Janvier 2010. Ainsi, c'est une obligation réglementaire pour les LBM d'être accrédités pour au moins 50% de leur activité avant fin 2016. Compte tenu de leur aspect innovant et hors nomenclature, les examens de biologie moléculaire, selon les critères de l'arrêté de Mai 2013, ne rentrent plus pour le moment dans le périmètre d'accréditation obligatoire. Bien que l'inclusion de ce type d'examens dans les obligations réglementaires ne saurait tarder, il apparait

surtout évident pour la qualité des examens réalisés et la sécurité de patient, de rationnaliser nos examens et de les rendre sous accréditation. La validation de méthode en biologie moléculaire est difficile à adapter selon les standards de la biologie générale. En effet, pour des raisons de rareté des échantillons, mais aussi des raisons de coûts, il est nécessaire d'adapter les recommandations émises par le COFRAC.

Matériel & Méthode

Nous avons procédé à la validation de la méthode de PCR TaqMan permettant l'analyse des mutations des codons 12 et 13 du gène *KRAS*. La méthodologie utilisée est adaptée des référentiels SH GTA 04 et des SH FORM 43 et 44 du COFRAC.

Résultats

La mise en œuvre de cette validation de méthode a permis de valider la PCR TaqMan pour la détection des mutations présentes sur les codons 12 et 13 du gène *KRAS* sur les tissus fixés au formol et inclus en paraffine chez les patients atteints de cancers colorectaux métastatiques.

Conclusion

La validation de méthode est une condition nécessaire pour rendre le résultat d'un examen sous accréditation. L'accréditation d'un laboratoire est une preuve de qualité et de fiabilité. La fiabilité de paramètres comme la répétabilité, la reproductibilité, la justesse, la sensibilité ou encore l'absence de contamination constitue autant de preuves de la qualité des résultats rendus et de la sécurité pour les patients chez qui les génotypages sont effectués.

Qualité-Accréditation

ANNALES DE BIOLOGIE CLINIQUE

Ann Biol Clin 2013 ; 71 (5) : 603-7

Validation de méthode selon la norme ISO 15189 et le SH GTA 04 : application à la détection des mutations *KRAS* par méthode TaqMan

Method validation according to ISO 15189 and SH GTA 04: application for the detection of KRAS mutations using PCR TaqMan assay

Alexandre Harlé[1,2,3]
Cindy Dubois[1]
Marie Rouyer[1]
Jean-Louis Merlin[1,2,3]

[1] Service de biopathologie, Institut de cancérologie de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

[2] CNRS, UMR 7039 CRAN, Nancy, France

[3] Université de Lorraine, Nancy, France
<a.harle@nancy.unicancer.fr>

Résumé. Depuis le 16 janvier 2010, la législation relative à la biologie médicale impose la mise en place de l'accréditation selon la norme ISO 15189 dans tous les laboratoires de biologie médicale (LBM). Ainsi, tous les LBM doivent être accrédités pour au moins une partie de leur activité avant fin octobre 2013. Les examens de biologie moléculaire font partie intégrante de la biologie médicale et sont également concernés par l'accréditation. La validation des méthodes de biologie moléculaire est cependant rendue délicate pour des raisons à la fois liées aux types de méthodes utilisées, mais aussi par le type d'analytes qui sont généralement assez rares. Cet article décrit, à titre d'exemple, la validation de la détection qualitative des mutations du gène *KRAS* dans les cancers colorectaux métastatiques par technique de PCR TaqMan selon la norme ISO 15189 et le guide technique d'accréditation de santé humaine du Cofrac SH-GTA-04.

Mots clés : *accréditation, Cofrac, KRAS, PCR TaqMan, SH GTA 04, validation de méthode*

Abstract. Since January 16th 2010, the French legislation requires that the medical laboratories must be accredited according to ISO 15189 standards. Thus, all medical laboratories in France must be accredited for at least part of their biological tests before the end of October 2013. Molecular biology tests are also concerned by the accreditation. Validation of molecular biology methods is made difficult, for reasons related to the methods, but also by the type of analytes that are basically rare. This article describes the validation of the qualitative detection of *KRAS* mutations in metastatic colorectal cancer using TaqMan PCR according to ISO 15189 and to the technical guide for accreditation in Human Health, SH-GTA-04, edited by the COFRAC.

Key words: *ISO 15189, KRAS, PCR TaqMan, method validation*

Article reçu le 6 mars 2013,
accepté le 5 avril 2013

Depuis le 16 janvier 2010, la législation relative à la biologie médicale impose la mise en place de l'accréditation selon la norme ISO 15189 [1] dans tous les laboratoires de biologie médicale (LBM) [2]. Ainsi, tous les LBM doivent être accrédités pour au moins une partie de leur activité avant fin octobre 2013. En 2016, 50 % des examens pratiqués devront être accrédités, 70 % en 2018 et 100 % en 2020.

Les examens de biologie moléculaire font partie intégrante de la biologie médicale et sont également concernés par l'accréditation [3]. Cependant, la validation des méthodes de biologie moléculaire est délicate pour des raisons à la fois liées aux types de méthodes utilisées, mais aussi par le type d'analytes. La détection de mutations somatiques en biologie tumorale est un exemple d'examen rentrant dans le périmètre de la biologie médicale et qui par conséquent nécessite une validation.

C'est donc dans ce contexte que nous avons mis en œuvre la validation de la détection qualitative des mutations du

Tirés à part : A. Harlé

doi:10.1684/abc.2013.0869

Pour citer cet article : Harlé A, Dubois C, Rouyer M, Merlin JL. Validation de méthode selon la norme ISO 15189 et le SH GTA 04 : application à la détection des mutations *KRAS* par méthode TaqMan. *Ann Biol Clin* 2013 ; 71(5) : 603-7 doi:10.1684/abc.2013.0869

© John Libbey Eurotext, 2013

Tirés à part de l'auteur

gène *KRAS* dans les cancers colorectaux métastatiques par technique de PCR TaqMan [4]. Cette méthode s'intègre dans la chaîne analytique décrite sur la *figure 1*. Pour mémoire, la recherche de mutation du gène *KRAS* dans les cancers colorectaux métastatiques est obligatoire pour la prescription de chimiothérapies associant un médicament ciblant les récepteurs à l'EGFR [5-7].
Cet article décrit les différentes étapes qui ont été mises en place pour la validation de la méthode de détection des mutations *KRAS* par méthode PCR spécifique d'allèle utilisant des sondes TaqMan. Cette technique permet la détection spécifique des 7 mutations les plus fréquentes du gène *KRAS* rencontrées dans les cancers colorectaux métastatiques [8] : G12D, G12R, G12A, G12S, G12V, G12C et G13D. Cette méthode étant adaptée de la littérature [4], elle est classée comme une méthode de portée B par le Cofrac et nécessite une validation complète.

Méthode

Nous avons suivi la méthodologie décrite par le Cofrac dans le SH GTA 04 (Révision 0 – avril 2011) [9] pour le design du plan expérimental nécessaire à la validation de méthode. Certaines recommandations ont dû être adaptées à la biologie moléculaire. Notre méthode étant qualitative et de portée B, la spécificité analytique, la sensibilité diagnostique, la contamination, la stabilité des réactifs, la robustesse et la comparaison avec d'autres méthodes, ont été étudiées. Cette méthode de PCR temps réel reposant sur celle décrite par Lièvre *et al.* [4], est effectuée sur un thermocycleur LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France) et les échantillons sont traités sur des plaques 384 puits (Roche Diagnostics, Meylan, France). Les résultats obtenus lors de la validation ont été ensuite reportés dans un formulaire SH-FORM-44 édité par le Cofrac [10].

Résultats

La validation de la spécificité analytique, c'est-à-dire la capacité de notre méthode à détecter les bons mesurandes, ici un type de mutation précis, a été réalisée en analysant de l'ADN témoin. Les ADN témoins sont extraits de lignées cellulaires connues pour leur type de mutations du gène *KRAS* (*tableau 1*). Ces témoins ont fait l'objet d'une validation par pyroséquençage. Des témoins négatifs, non mutés pour le gène *KRAS*, ont également été validés de la même façon. La positivité ou la négativité des témoins en fonction du type d'amorces et de sondes a ainsi permis de valider la spécificité de notre méthode : chaque sonde est spécifique d'une mutation et aucune détection croisée ne se produit.
La sensibilité diagnostique a été évaluée par l'étude de solutions d'ADN à différentes concentrations. Ainsi, des séries de dilutions contenant un mélange d'ADN témoin muté dans de l'ADN témoin non muté ont été réalisées. Ces séries ont été effectuées aussi bien sur de l'ADN extrait de témoins cellulaires que sur des ADN humains caractérisés par leur mutation.
Les gammes des dilutions ainsi que les résultats de sensibilité sont présentés dans le *tableau 2*. L'étude de la spécificité analytique a ainsi permis de déterminer que notre méthode de détection permet la détection de 1 à 5 % d'ADN muté [11].
L'absence de contaminations a été évaluée tout au long de notre chaîne analytique (*figure 1*). Nous ne décrirons ici que les résultats obtenus lors des étapes qui nous ont permis de s'assurer de l'absence de contamination dans la phase de PCR. Tout d'abord, nous avons utilisé un échantillon « vierge » de tout ADN pour tester l'absence de contamination tout au long de notre chaîne analytique. Ainsi, un bloc de paraffine ne contenant aucun tissu a été traité de la même manière que tous les autres échantillons durant tout le processus analytique. L'absence d'amplification d'ADN dans

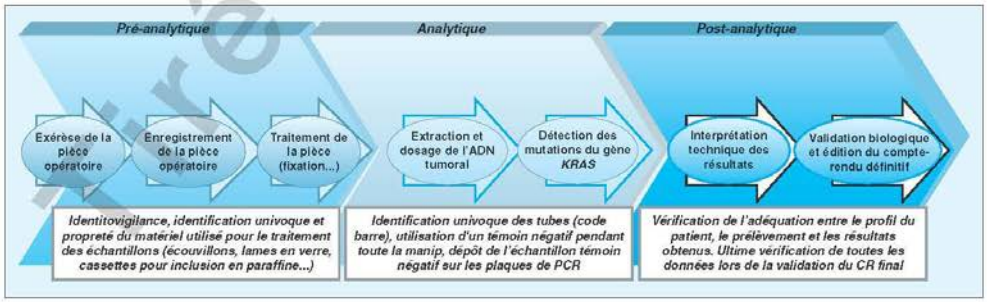


Figure 1. Schéma de la chaîne analytique considérée pour la validation de méthode. Pour chaque étape, une vérification de la contamination est nécessaire.

© John Libbey Eurotext, 2013

Tableau 1. Témoins cellulaires utilisés pour l'ADN témoin.

	Position sur le gène *KRAS*							
	Codon 12						Codon 13	
Type de mutation	G12S	G12R	G12C	G12D	G12A	G12V	G13D	Sauvage
Lignée cellulaire	LS123	CAL-62	H358	A427	H1573	SW620	LoVo	WiDr

Tableau 2. Résultats des tests de sensibilité analytique. La gamme est réalisée en mélangeant de l'ADN muté dans de l'ADN non muté.

	Codon 12						Codon 13
	G12S	G12R	G12C	G12D	G12A	G12V	G13D
Pourcentage d'ADN muté minimum ayant permis la détection de la mutation	5,0 %	5,0 %	1,0 %	1,0 %	2,5 %	1,0 %	2,5 %

les puits correspondants, nous permet d'affirmer qu'aucune contamination d'ADN n'a eu lieu.

Pour s'assurer qu'aucune contamination n'était présente sur notre plaque, nous avons procédé à une analyse selon un schéma en damier : chaque échantillon contenant de l'ADN étant ainsi encadré par du mix réactionnel ne contenant pas d'ADN (*figure 2*).

La stabilité des réactifs a également été étudiée : tous les réactifs utilisés sont accompagnés de recommandations de fournisseurs. Ainsi, certains réactifs doivent être conservés à -20 °C ± 5 °C et d'autres à +5 °C ± 3 °C. Les réactifs devant être stockés en froid négatif ont été stockés pendant 6 semaines en froid positif (6 semaines correspondant à peu près à la durée d'utilisation classique dans notre laboratoire). Chaque semaine, les réactifs testés ont été intégrés dans une série d'analyses, qui elles étaient réalisées avec des réactifs conservés dans les conditions recommandées. Aucun impact de la température de stockage des réactifs n'a été mis en évidence (*figure 3*).

L'étude de la robustesse a été effectuée en faisant varier les différents paramètres jugés comme critiques dans notre examen. Ainsi, nous avons fait varier les volumes de préparation de notre mix réactionnel, les volumes de dépôts de nos échantillons ou encore la concentration de nos échantillons de 5 à 20 ng/µL (20 ng/µL étant la concentration normale utilisée lors de notre analyse). Des mix ont été effectués en faisant varier les volumes un à un de ± 2 s, s étant l'écart type de mesure fourni par notre prestataire responsable de l'étalonnage et la calibration de nos micropipettes). Les résultats obtenus ont été comparés avec ceux obtenus avec le mix protocolaire. Cette étude n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative entre les différents résultats obtenus dans l'intervalle [- 2 s ; +2 s] (*tableau 3*).

Notre méthode a enfin été comparée avec 3 autres méthodes utilisées au laboratoire : une méthode marquée CE-IVD de portée A (Cobas KRAS z480, Roche Diagnostics) [12] et deux méthodes développées en interne au laboratoire (une méthode RFLP et une méthode HRM) [11]. Ces comparaisons de méthodes ont permis de mettre en évidence un certain nombre de cas discordants. Chaque cas discordant a fait l'objet d'une étude particulière.

Bien que ne faisant pas partie des exigences décrites dans le SH GTA 04 pour les méthodes qualitatives de portée B, nous avons également étudié la répétabilité et la reproductibilité de nos examens. Pour la répétabilité, le même échantillon a été déposé plusieurs fois sur la même plaque et nous nous sommes assurés que chaque échantillon déposé présentait des résultats comparables aux autres. Les paramètres étudiés étaient le nombre de Cp et la conclusion de l'interprétation du résultat. La reproductibilité ou fidélité intermédiaire a été étudiée en faisant traiter les mêmes échantillons, en duplicates, que ceux utilisés pour l'étude de la répétabilité. Ces échantillons ont ainsi été testés à une semaine d'intervalle par des opérateurs différents. Cette étude a permis d'affirmer que notre méthode d'analyse était à la fois répétable et reproductible.

Discussion et conclusion

Cet exemple de validation de méthode qualitative de portée B peut être adapté à tout autre type d'examen de PCR temps réel. Il est important de noter qu'une validation de méthode n'est jamais totalement exhaustive et une amélioration continue est nécessaire. Toute nouvelle manip de validation doit être conservée avec le dossier de validation et être listée dans la liste des enregistrements du laboratoire. La robustesse de la méthode est l'un des paramètres pouvant sans cesse être amélioré. Par exemple, il serait intéressant dans le cas présenté ici, de faire varier les températures des

© John Libbey Eurotext, 2013

Version auteur

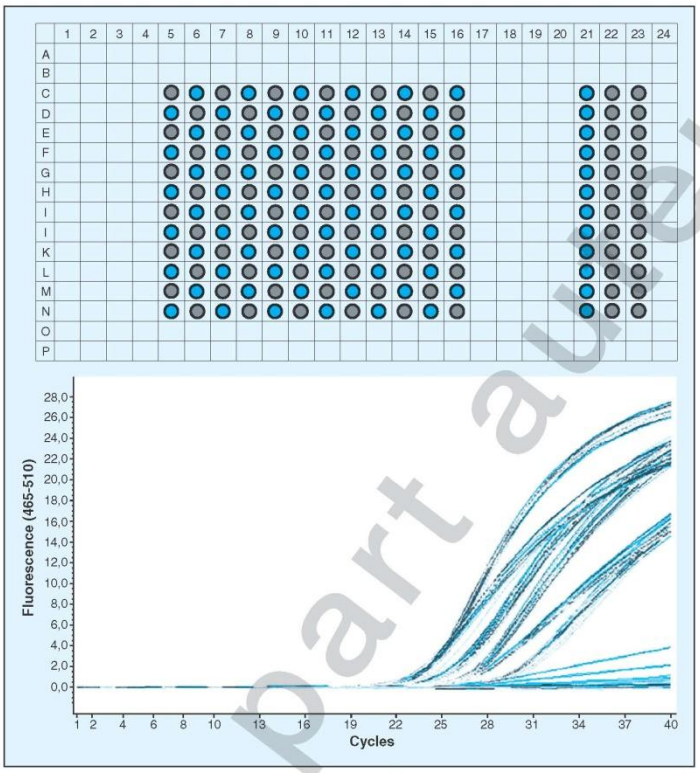


Figure 2. Schéma de plaque pour la vérification d'absence de contamination inter-puits. Un puits sur deux est rempli soit uniquement avec du mix, soit avec du mix et de l'ADN. Dans le logiciel d'analyse, une absence d'amplification se traduit par une coloration bleue tandis que la présence d'une amplification se traduit par une coloration orange (grise sur la figure). Les colonnes 21, 22 et 23 servent de témoins (mix seul, ADN muté et ADN non muté respectivement). Les courbes présentées en dessous sont les courbes d'amplification (fluorescence mesurée en fonction du nombre de cycles de PCR).

cycles de PCR de +/- 1 °C, pour s'assurer qu'une variation de l'étalonnage de la sonde thermique de notre thermocycleur n'aurait pas d'impact sur nos analyses.

La contamination est également un paramètre clé à maîtriser et auquel il faut être particulièrement attentif. Cette absence de contamination doit absolument être vérifiée à toutes les étapes qu'elles soient pré-, per- ou post analytiques. Une attention toute particulière doit ainsi être apportée afin de s'assurer que le résultat d'examen est bien celui du patient concerné. Il ne faut pas exclure également de tester ce que donnerait une contamination volontaire de nos « témoins de non contamination », afin de s'assurer de leur efficacité. Dans le cas présent, il suffirait par exemple de déposer 0,1 µL d'un échantillon connu dans le puits servant au témoin de non contamination et voir si le système détecte la présence d'ADN.

Il est enfin important de noter que le Cofrac apporte une importance et une attention toutes particulières à l'étude bibliographique. Dans le cas de la biologie moléculaire, peu de données bibliographiques sont actuellement disponibles : la plupart des papiers techniques décrivent la méthode de façon concise et les différents tests de mise au point, qui pourraient éventuellement servir de données pour les tests de robustesse, ne sont pas publiés. Il semble donc important que chaque laboratoire puisse publier ou rendre publique ses différentes validations de méthodes afin d'aider à l'amélioration globale des pratiques des laboratoires de biologie médicale.

© John Libbey Eurotext, 2013

Tirés à part auteur

Tableau 3. Étude de la robustesse par modification des volumes prélevés lors de la préparation du mix ou lors du dépôt de l'échantillon d'ADN à tester. Les mix E1, E2 et E3 sont réalisés dans les proportions habituelles, seul le volume de l'échantillon à tester varie. Les autres mix font varier soit le volume de genotyping mix, de l'assay mix G12D ou de l'eau.

		Volume à préparer en triplicates (µL) (dépôt : duplicates)											
Réactifs	**Volume (µL)**	**E1**	**E2**	**E3**	**E4**	**E5**	**E6**	**E7**	**E8**	**E9**	**TM[a]**	**TnM[b]**	**Neg[c]**
Genotyping mix	2,680	5,36	5,36	5,30	6,84	9,24	8,04	8,04	8,04	8,04	5,36	5,36	5,36
Assay mix G12D	0,13	0,26	0,26	0,26	0,39	0,39	0,27	0,51	0,39	0,39	0,26	0,26	0,26
Eau	2,19	4,38	4,38	4,38	6,57	6,57	6,57	6,57	5,37	7,77	4,38	4,38	4,38
Dépôt échantillon (µL)	1	1,00	0,60	1,40	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
		E1	**E2**	**E3**	**E4**	**E5**	**E6**	**E7**	**E8**	**E9**	**TM**	**TnM**	**Neg**
Cp[d]		27,78	28,66	27,09	27,59	27,27	26,59	28,77	28,17	27,61	28,8	29,13	-
Résultat		Muté	Muté	Muté	Muté	Muté	Muté	Muté	Muté	Muté	Muté	Non muté	-

[a] Témoin muté, [b] Témoin non muté, [c] Témoin négatif d'amplification, [d] moyenne = 27,95 – Ecart type = 0,81.

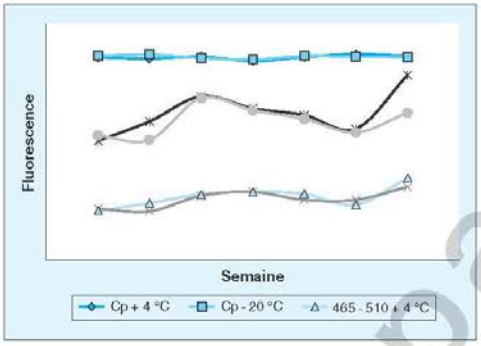


Figure 3. Influence de la température de stockage des réactifs sur la qualité de l'amplification de l'ADN. Exemple de résultats obtenus avec de l'ADN muté G12S sur une période de 6 semaines (de S0 à S6). Les paramètres étudiés sont le nombre de cycles avant amplification de l'ADN (Cp) et l'absorption en florescence (465-510 nm et 533-580 nm).

Liens d'intérêts : aucun.

Références

1. Norme ISO 15189. Paris : Afnor, 2012.

2. Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale. *Journal officiel de la République française* du 15 janvier 2010 : 819.

3. Portées types d'accréditation - SH INF 50 - Révision #00. Paris : Cofrac, 2011.

4. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, *et al.* KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006 ; 66 : 3992-5.

5. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, *et al.* Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009 ; 27 : 663-71.

6. De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, *et al.* KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol* 2008 ; 19 : 508-15.

7. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, *et al.* Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009 ; 360 : 1408-17.

8. Custodio A, Feliu J. Prognostic and predictive biomarkers for epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer : beyond KRAS mutations. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013 ; 85 : 45-81.

9. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/Validation (portée B) des méthodes en biologie médicale - SH GTA 04 - Révision #00. Paris : Cofrac, 2011.

10. Fiche type qualitatif - Vérification (portée A) /Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale - SH FORM 44 - Révision #00. Paris : Cofrac, 2011.

11. Chretien AS, Harlé A, Meyer-Lefebvre M, Rouyer M, Husson M, Ramacci C, *et al.* Optimization of routine KRAS mutation PCR-based testing procedure for rational individualized first-line-targeted therapy selection in metastatic colorectal cancer. *Cancer Med* 2013 ; 2 : 11-20.

12. Harlé A, Busser B, Rouyer M, Harter V, Genin P, Leroux A, *et al.* Comparison of COBAS 4800 KRAS, TaqMan PCR and high resolution melting PCR assays for the detection of KRAS somatic mutations in formalin-fixed paraffin embedded colorectal carcinomas. *Virchows Arch* 2013 ; 462 : 329-35.

© John Libbey Eurotext, 2013

Tiré à part auteur

Chapitre IV

Nouveaux biomarqueurs prédictifs de résistance aux anti-EGFR, étude au niveau des gènes et étude de l'expression des phosphoprotéines en aval des voies RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT/mTOR

IV. Nouveaux biomarqueurs prédictifs de résistance aux anti-EGFR, étude au niveau des gènes et étude de l'expression des phosphoprotéines en aval des voies RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT/mTOR

La présence de mutations de *RAS* (*KRAS* et *NRAS*) est un marqueur validé de la réponse aux traitements par anti-EGFR. Cependant, les essais ayant étudié l'utilisation du cetuximab ou du panitumumab chez des patients ne présentant pas de mutations de *RAS* tendent à prouver qu'il existe d'autres facteurs prédictifs de résistance à ces traitements. En effet, parmi les patients présentant des tumeurs *RAS* wild-type, seuls 40 à 60% présentent une réponse lors de l'utilisation d'anti-EGFR en association à la chimiothérapie (11). L'étude des voies de signalisation impliquées dans les cancers colorectaux semble une piste intéressante, puisqu'il est désormais connu que ces voies interviennent pleinement dans les mécanismes de tumorisation puis pendant le développement de la maladie (4). Les voies RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT/mTOR font partie des voies connues comme intervenant dans les cancers colorectaux métastatiques. C'est pourquoi nous avons réalisé l'étude de l'expression des phosphoprotéines impliquées dans ces deux voies de signalisation par méthode BioPlex® Protein Array (BPA). Une population de patients atteints d'un cancer colorectal métastatique et dont les tumeurs ne présentent pas de mutations de RAS a été sélectionnée et étudiée afin de déterminer si l'expression des phosphoprotéines pouvait être une indication pour prédire le taux de réponse, la survie sans progression ou encore la survie globale chez ces patients.

Introduction

Les dernières recherches pour le traitement des cancers colorectaux métastatiques ont mené au développement de médicaments capables d'inhiber l'activation de EGFR et des voies de signalisation

en aval. Cependant, chez les patients dont les tumeurs ne présentent pas de mutation de *RAS*, seulement 40 à 60% des patients répondent au traitement, ce qui signifie qu'un grand nombre ne bénéficie pas du traitement, et cela sans cause apparente. L'absence d'expression ou la surexpression des protéines des voies de signalisation en aval d'EGFR pourraient avoir un impact sur la réponse au traitement chez les patients traités par des anti-EGFR.

Matériel & Méthode

Cent échantillons de tumeurs provenant de patients atteints d'un cancer colorectal métastatique et réfractaire aux chimiothérapie FOLFOX ou FOLFIRI et ayant traité par une combinaison chimiothérapie + anti-EGFR ont été collectés. Les évolutions cliniques ont été mesurées selon les critères RECIST, la survie sans progression et la survie globale. La recherche de mutations RAS et BRAF a été effectuée sur tous les échantillons, ainsi que la mesure quantitative de l'expression de pEGFR et des protéines en aval, pAKT(Ser473), pERK1-2(Thr202/Tyr204, Thr185/Tyr187), pGSK3(Ser21/Ser9), pIGF1R(Tyr1131), pMEK1(Ser217/Ser221), pP70S6K(Thr421/Ser424), pP90RSK(Thr359/Ser363) par la technique Bioplex® Protein Array.

Résultats

Sur les 100 échantillons analysés, 60 ne présentaient pas de mutation de *RAS*. Sur les patients dont les tumeurs ne présentaient pas de mutation de RAS, 45,0% ont eu une réponse complète ou partielle, tandis que 55,0% ont eu une maladie stable ou une progression tumorale. La survie sans progression et la survie globale étaient significativement plus faibles chez les partients dont les tumeurs présentaient des mutations de RAS (HR=3,04 [1,91;4,83];p<0,001 et HR=2,49 [1,56;3,97];p<0,001 respectivement). L'expression de pAKT, pERK1/2 et pMEK1 était significativement moins élevée ches les patients dont les tumeurs ne présentaient pas de mutation

de *RAS* (p=0,0246 ; p=0.004 ; p=0,0110 respectivement). Chez les patients dont les tumeurs ne présentaient pas de mutation de RAS, le taux de réponse était significativement plus élevé pour les tumeurs surexprimant pEGFR et pAKT (p=0,0258 et p=0,0277 respectivement).

Discussion

Ces données suggèrent que la surexpression de pEGFR et de pAKT dans les tumeurs de patients ne présentant pas de mutation de RAS et traités par anti-EGFR pourrait être un biomarqueur de réponse à ce type de traitement. Sur la base de ces résultats, nous faisons l'hypothèse qu'une association d'un anti-EGFR and un inhibiteur d'AKT pourrait présenter un intérêt dans le traitement du cancer colorectal métastatique.

Original Article (Soumis dans Annals of Oncology, Octobre 2014)

Expression of pEGFR and pAKT as response predictive biomarkers for *RAS* wild-type patients to anti-EGFR monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancers

A. Harlé[1,2,3], J. Salleron[4], G. Perkins[5], C. Pilati[5], H. Blons[5], P. Laurent-Puig[5], JL. Merlin[1,2,3]

[1] Université de Lorraine
Faculté de Pharmacie
54001 Nancy, France

[2] CNRS UMR 7039 CRAN
54506 Vandoeuvre les Nancy, France

[3] Institut de Cancérologie de Lorraine
Service de Biopathologie
54519 Vandoeuvre les Nancy, France

[4] Institut de Cancérologie de Lorraine
Cellule Data Biostatistique
54519 Vandoeuvre les Nancy, France

[5] Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM),
Unité Mixte de Recherche (UMR)-S1147
Personalized Medicine, Pharmacogenomics, Therapeutic Optimization,
Université Paris Descartes
45 rue des Saints Pères
75006 Paris, France

Corresponding author
Dr. Alexandre Harlé
Service de Biopathologie
6 Avenue de Bourgogne
CS 30519 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex - France
Tel. +33 3 83 59 86 73
a.harle@nancy.unicancer.fr

Abstract *300/300 words*

Background Recent efforts to improve the treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC) has led to the development monoclonal antibodies (mAb) that inhibit the activation of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and its downstream pathways. However, in *RAS* wild-type patients, the response rates to anti-EGFR mAb ranged from only 40 to 60% which results in a large fraction of patients without any known causes for treatment failure. Absence or overexpression of EGFR downstream proteins under their active phosphorylated forms may be of interest to predict response to anti-EGFR in *RAS* wild-type patients.
Materials & Methods One-hundred tumor samples were collected from patients with mCRC refractory to FOLFOX and/or FOLFIRI and treated by a combination of chemotherapy with anti-EGFR mAb. The outcomes were measured on response evaluation criteria in solid tumor (RECIST), progression free survival (PFS), and overall survival (OS). All samples were assessed for *RAS* and *BRAF* mutations and $pEGFR_{(Tyr)}$ and key phosphorylated proteins of EGFR downstream signaling pathway $pAKT_{(Ser473)}$, $pERK1\text{-}2_{(Thr202/Tyr204,\ Thr185/Tyr187)}$, $pGSK3_{(Ser21/Ser9)}$, $pIGF1R_{(Tyr1131)}$, $pMEK1_{(Ser217/Ser221)}$, $pP70S6K_{(Thr421/Ser424)}$, $pP90RSK_{(Thr359/Ser363)}$ were quantitatively analyzed using BioPlex® Protein array.
Results Among the 100 tumor samples, 60 were *RAS* wild-type. Among the *RAS* wild-type patients, 45.0% achieved a complete or partial response when treated with anti-EGFR mAb. Patients with a *RAS* mutation had significant lower PFS (HR=3.04 [1.91;4.83];p<0.001) and OS (HR=2.49 [1.56;3.97];p<0.001). Expression of pAKT, pERK1/2 and pMEK1 was significantly lower in *RAS* wild-type patients (p=0.0246; p=0.004; p=0.0110 respectively). In *RAS wild-type* patients, response rate was significantly higher for tumors who express pEGFR and pAKT (p=0.0258 and p=0.0277 respectively).
Conclusions In conclusion, these data suggest that the overexpression of pEGFR and pAKT may be response predictive biomarkers for *RAS* wild-type patients treated with anti-EGFRmAb and on the basis of our results, we hypothesize that the association of anti-EGFRmAb and anti-AKT therapies could be of interest.

Key words metastatic colorectal cancer, cetuximab, panitumumab, RAS, EGFR, phosphoproteins

Key message 337/*400 characters*

Overexpression of pAKT and pEGFR may be response predictive biomarkers for RAS wild-type patients with mCRC. Genotyping and BioPlex Protein Array are suitable to assess *RAS* mutations and explore expression of EGFR downstream proteins. Our data suggest that association of anti-EGFR mAb and pAKT may be of interest for patients with mCRC.

Introduction

Colorectal cancer is the third most common cancer worldwide with more than one million patients diagnosed each year, among 50% will develop metastatic disease (122, 124). Recent efforts to improve the treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC) has led to the development of monoclonal antibodies such as cetuximab and panitumumab, that inhibit the activation of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and its downstream pathways (namely RAS/RAF/MAPK and PI3K/AKT/mTOR) that promote cell growth, proliferation, inhibition of apoptosis, invasion and metastasis. Evidence have first showed, that patients with codon 12 or 13 *KRAS*-mutant tumors receive little or no benefit from anti-EGFR therapies as single agents or combined with chemotherapy (7, 10, 125, 126). More recent studies revealed that the presence of mutations on exons 2, 3 and 4 of *KRAS* or *NRAS* were also predictive of resistance to anti-EGFR therapies (8, 27). In other words, cetuximab or panitumumab show benefits only to "*RAS* wild-type" patients, i.e patients with tumors that are not bearing mutations on exons 2, 3 and 4 of *KRAS* and *NRAS*. These findings led the European Medicine Agency (EMA) the use of cetuximab and panitumumab to patients with *RAS* wild-type tumors.

However, from studies including *RAS* wild-type patients, the response rates to cetuximab or panitumumab therapy ranged from only 40 to 60% (11) which results in a large fraction of patients without any known causes for treatment failure. The presence of alterations in other genes such as *PIK3CA* or *BRAF* in the EGFR-dependent signaling pathways (8, 127, 128) is responsible for some of the non-responding cases. Moreover, overexpression or alterations on proteins such as PTEN, PI3K, AKT, involved in the RAS/RAF/MAPK or PI3K/AKT/mTOR signaling pathways can have a significant impact on cell proliferation or apoptosis. Absence or overexpression of proteins under their phosphorylated forms may be of interest to predict response to anti-EGFR mAb. Ligand fixation of the EGF receptor activate downstream signalling proteins like RAS, MEK, ERK or P90 in the RAS/RAF/MAPK pathway and AKT, GSK and P70 in the PI3K/AKT/mTOR

pathway. The fixation of ligand on the receptor activate the kinase activity which is responsible of the activation by phosphorylation of downstream proteins. The study of the expression of the downstream proteins under their phosphorylated forms is important to understand mechanisms of resistance to anticancer drugs and more precisely in our study of anti-EGFR drugs. In a previous study, we showed that the expression level of EGFR downstream signalling phosphoproteins (pMEK1 and pP70S6K) could predict longer progression free survival (PFS) and overall survival (OS) in KRAS exon 2 wild-type mCRC using multivariate analysis (129).

In this paper, we describe the impact of *RAS* mutations (i.e. *KRAS* and *NRAS* exons 2, 3 and 4 mutations) and of the expression of proteins involved in RAS/RAF/MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in their active phosphorylated forms on the response to anti-EGFR monoclonal antibodies in patients *RAS* wild-type with an advanced colorectal cancer. The 42 patients population described in our previous study (129) has been extended to 100 patients and the research of mutations has been also extended from *KRAS* exon 2 to *RAS* (*KRAS*, *NRAS*) exons 2, 3 and 4.

Patients and methods

Patients

One-hundred tumor samples were collected from patients with metastatic colorectal cancer treated by a combination of chemotherapy with anti-EGFR therapy. Characteristics of the patients are shown in ***table 1***. All patients were refractory to FOLFOX and/or FOLFIRI regimen and were treated with anti-EGFR antibodies. In summary, 95% of the patients were treated by a combination of anti-EGFR and irinotecan, 2% were treated by a monotherapy using cetuximab or panitumumab, 1% were treated by a combination of anti-EGFR with a chemotherapy associating 5-fluorouracil and oxaliplatin and 1% were treated by 5-fluorouracil. The outcomes were measured on response evaluation criteria in solid tumor (RECIST), progression free survival (PFS), and overall survival (OS). Patients with complete and partial response were considered as responders and patients with stable disease or progression as non-responders. Tumors were collected at time of surgery. All samples were available either as frozen samples and formalin-fixed paraffin-embedded tissues.

Proteins extraction

Whole cell protein extraction was performed from 5-mm frozen tumor tissues using the Kit RIPA lysis Buffer 1X (Tebubio, Le Perray en Yvelines, France) prepared with inhibitors (PMSF, protease inhibitor cocktail and sodium orthonavate) (Dutscher, Brumath, France) according to the manufacturer's recommendations.

Phosphoproteins analysis

The expression of phosphorylated-EGFR ($pEGFR_{(Tyr)}$ and key phosphorylated proteins of EGFR downstream signaling pathway $pAKT_{(Ser473)}$, $pERK1\text{-}2_{(Thr202/Tyr204,\ Thr185/Tyr187)}$, $pGSK3_{(Ser21/Ser9)}$, $pIGF1R_{(Tyr1131)}$, $pMEK1_{(Ser217/Ser221)}$, $pP70S6K_{(Thr421/Ser424)}$, $pP90RSK_{(Thr359/Ser363)}$ were quantitatively analyzed in freshly-frozen samples using BioPlex®

Protein assay (BPA) (BioRad®, Marnes-la-coquette, France) as previously described (130). This technique is based on multiplex sandwich bead immunoassays. Protein extracts were transferred into 96-well dishes and diluted with buffered solution. Fluorescent capture beads coupled to antibodies directed against the phosphoproteins $pEGFR_{(Tyr)}$, $pAKT_{(Ser473)}$, $pERK1\text{-}2_{(Thr202/Tyr204,\ Thr185/Tyr187)}$, $pGSK3_{(Ser21/Ser9)}$, $pIGF1R_{(Tyr1131)}$, $pMEK1_{(Ser217/Ser221)}$, $pP70S6K_{(Thr421/Ser424)}$, $pP90RSK_{(Thr359/Ser363)}$ were mixed, and added into each well and incubated overnight. Following incubation, the plates were washed and incubated with biotinylated antibodies fixing each target protein. Streptavidin– phycoerythrin solution was then added. The analysis consisted in a double laser fluorescence detection allowing simultaneous identification of the target protein through the red fluorescence emission signal of the bead and quantification of the target protein through the fluorescence intensity of phycoerythrin. Results were recorded as mean fluorescence intensities and compared to negative controls. Positive controls consisting of standard protein extracts from cell lines were added to each series. All results were normalized through the different batches of analyses by the same mutated tumor sample. The expression level of each phosphoprotein was recorded as fluorescence arbitrary unit. BPA assay requires 15–20 mg of tissue containing more than 50% of tumor material or equivalent amount of protein extract (i.e., 25 mg total protein per assay in triplicate).

Determination of KRAS, NRAS and BRAF mutations

KRAS exons 2 and 3 and *BRAF* exon 15 mutation status were assessed by allelic discrimination using Taqman® qPCR probes as previously described (7, 128). *KRAS* exon 4 and *NRAS* exons 2, 3 and 4 mutation stats were assessed using Sanger sequencing and next generation sequencing. Patients with wild-type tumors for exons 2, 3 and 4 of *KRAS* and *NRAS* were considered as « *RAS* wild-type ».

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SAS software (SAS Institute, Cary, NC 25513; version 9.2). A P-value <0 .05 was considered as statistically significant.

Quantitative variables were described by mean, median and inter-quartile range and qualitative variables by frequency and percentage. The normality of the distribution of the expression of each phosphoproteins were assessed with the Shaprio-Wilk test.

Overall survival (OS) and progression free survival (PFS) were described using the Kaplan-Meier method and compared between *RAS* mutations status with bivariate Cox proportional hazard model. Comparisons of each phosphoprotein according to the *RAS* mutations status were performed by a Mann-Whitney U test.

In the subgroup of *RAS* wild-type patients, the discriminant power of each phosphoprotein to predict the response rate was estimated with the area under the Receiver Operating Characteristic (AUC) and their 95% confidence intervals. An AUC greater than 0.8 means that the phosphoprotein could differentiate the responders from the nonresponders. Each phosphoprotein was then dichotomized according to the best cut-off maximizing the sensitivity and the specificity. These thresholds were computed thanks to the Youden Index.
The percentage of response rate were calculated for each level of the new binary variables and compared with a Chi-square test or a Fisher Exact test. The odds ratio and their 95% confidence interval were computed with a bivariate logistic regression.
The phosphoproteins with a p-value less than 0.2 in bivariate analysis were introduced in a multivariate logistic regression with backward selection (131). The stability of the selected model was investigated using the bootstrap resampling method (132).

RESULTS

Among the 100 tumor samples, 40 were found with a *RAS* mutation (36% with *KRAS* mutation and 4% with *NRAS* mutation) and 60% were *RAS* wild-type. Among the *RAS* wild-type patients, 45.0% achieved a complete or partial response, and 55.0% had a stable disease or progression ($p<0.001$) when treated with anti-EGFR. Patients with a *RAS* mutation had significant lower PFS (HR=3.04[1.91; 4.83]) and OS (HR=2.49[1.56; 3.97]). PFS ad OS were significantly higher in *RAS* wild-type patients (***figure 1***). Expression of pAKT, pERK1/2 and pMEK1 was significantly lower in *RAS* wild-type patients than in *RAS* mutated patients ($p=0.0246$; $p=0.004$; $p=0.0110$ respectively) and no significant difference was observed between *RAS* wild-type and *RAS* mutated tumors in the expression of pEGFR, pGSK3, pIGFR, pP70S6K and pP90SRK – ***Table 2***.

In *RAS wild-type* patients, the areas under the curve (AUC) of the expression of each phosphoprotein according to response rate were under 0.80. After dichotomizing the expression of each phospohprotein with the best threshold to maximize the sensitivity and the specificity, response rate was significantly higher for tumors who express pEGFR and pAKT above the calculated threshold ($p=0.0258$ and $p=0.0277$ respectively). No significant relation was found between response rate and the level of expression of the other phosphoproteins – ***Table 3 a***.

These two phospohproteins remained statistically significant in multivariate analysis to predict response after bootstrap validation – ***Table 3b***. The AUC of the model was 0.673.

No statistically significant difference was found between expression of phosphoproteins and PFS or OS in *RAS* wild-type tumor bearing patients (data not shown).

Discussion

The development of molecular biology and knowledge about signalling pathways in cancer have been a real opportunity to improve treatment for patients with metastatic colorectal cancer. The history of *RAS* and the use of anti-EGFR therapies is characteristic of the importance of identifying response predictive biomarkers and molecular testing. Unluckily, a large proportion of *RAS* wild-type patients do not reach benefit from anti-EGFR targeted therapies and it is important to explore new targets and identify patients who will benefit from targeted therapies. The selection of these patients is crucial to avoid unworthy toxicities or inefficient treatment, but also for economic issues.

In our study, the repartition of *RAS* mutation in the studied population is consistent with previously published data (27). The observed response rate is also consistent with known data with few or no response in *RAS* mutant tumor (36). Complete or partial responses were achieved in approximately 45.0% of *RAS* wild-type tumor bearing patients which is higher than previous published data for patients treated in second or further line with an association anti-EGFR and FOLFIRI (133). This difference can probably be related to the lower median age of our population and the better WHO status.

The level of expression of phosphoproteins in the *RAS* mutated patients was found significantly higher than in RAS wild-type patients as we expected. The accumulation of RAS protein under its activated form cause the activation of RAF/RAS/MAPK and PI3K/AKT/mTOR signalling pathways resulting an overexpression of the downstream proteins involved in these pathways (5).

In our study, the level of expression of phosphoproteins was measured by Bioplex® protein Array (BPA) and not by immuhohistochemistry. BPA is a validated method and comparable to western blot (130). Most of the studies published in the literature are using western blot or immunohistochemistry, which are qualitative and semi-quantitative assays respectively. BPA is a quantitative assay and allows more precision in the measurement of level of

phosphorylated proteins. However, immunohistochemistry allows the determination of the expression according to the localization of the target – i.e. nucleus, cytoplasm, stroma,... – whereas BPA is using the whole tumor and is unable to determine the localization of the overexpression in the cell. This difference of technical approach may be responsible of the discrepancies we will discuss further in this paragraph.

Overexpression of pEGFR and pAKT were significantly associated with higher response rate in *RAS* wild-type patients but no statistically significant relation was found between the expression of phosphoproteins and PFS and OS. These date do not confirm our previously published data (129). In the study published in 2010, by Perkins *et al.*, PFS was related to a lower expression of pMEK and pP70S6K in wild-type *KRAS* exon 2 tumors bearing patients. Among the 42 patients included in this study, only 23 were wild-type *KRAS* tumors bearing. The lack of subjects in the wild-type *KRAS* class and the impact of *KRAS* exons 3, 4 and *NRAS* exons 2, 3 and 4 mutations may explain this difference with our present data. The relation between the overexpression of pEGFR and response rate has already been described by Razis *et al.* (134) and can be explained by the avidity of the tumor cell for its ligand: the more the cell is dependent from its ligand, the more EGFR will be expressed and the more anti-EGFR will be effective against tumor cells. Considering this ligand avidity, it is not surprising that a better response rate was achieved with anti-EGFR with *RAS* wild-type tumors overexpressing pEGFR. More surprisingly, a significant relation have been found between higher response rate and overexpression of pAKT. It is known that activation of AKT is dependent of the activation of EGFR (135). It has also been described that expression of pAKT was associated with lower response rate and lower PFS (136), but the studied population was selected between 2007 and 2011 and no indication mention if the patients treated by anti-EGFR were only *RAS* wild-type or not. In our study, the expression of pAKT was associated with a higher response rate but no statistically significant difference in PFS and OS was found (HR=1.004 ; CI 95% [0.995 ; 1.013] and HR=1.006 ; CI 95% [0.996 ; 1.016] repescrively). In the study of Saglam *et al.*, an increasing of pAKT expression has

been described during colorectal cancer progression (137). We hypothesize that the overexpression of pEGFR induce better response rate for *RAS* wild-type patients treated by anti-EGFR, but this overexpression of pEGFR induce an overexpression of pAKT which leads to progression and annihilate anti-EGFR benefits and explain that no statistically significant difference in PFS was found. As already suggested, AKT may be an interesting target in colorectal cancers (138, 139). Ongoing trials are currently testing an allosteric inhibitor of AKT, the MK-2206 (139, 140) in patients with mestastatic colorectal cancer. On the basis of our results, we hypothesize that associating anti-EGFR and anti-AKT therapies may be of interest in RAS wild-type patients.

In conclusion, these data suggest that the overexpression of pEGFR and pAKT may be response predictive biomarkers for RAS wild-type patients treated with anti-EGFR and on the basis of our results, we hypothesize that the association of anti-EGFR and anti-AKT therapies could be of interest.

Acknowledgment

This work has been supported by the translational research program INCa 2009-1-RT-03 and the FP7 APODECIDE

Disclosures

The authors declare that they have no conflict of interest related to this work.

References

1. Tougeron D, Lecomte T, Pages JC et al. Effect of low-frequency KRAS mutations on the response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. Ann Oncol 2013; 24: 1267-1273.

2. Jemal A, Bray F, Center MM et al. Global cancer statistics. Ca 2011; 61: 69-90.

3. De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J et al. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. Ann Oncol. 2008; 19: 508-515.

4. Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F et al. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. Br J Cancer. 2007; 96: 1166-1169.

5. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ et al. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. J Clin Oncol. 2007; 25: 3230-3237.

6. Lievre A, Bachet JB, Boige V et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. J Clin Oncol. 2008; 26: 374-379.

7. Douillard JY, Oliner KS, Siena S et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. N Engl J Med 2013; 369: 1023-1034.

8. Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A et al. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. Ann Oncol 2014.

9. Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaloupiti D et al. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. Lancet Oncol. 2008; 9: 962-972.

10. Custodio A, Feliu J. Prognostic and predictive biomarkers for epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer: beyond KRAS mutations. Crit Rev Oncol Hematol 2013; 85: 45-81.

11. Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. J Clin Oncol. 2009; 27: 5924-5930.

12. Perkins G, Lievre A, Ramacci C et al. Additional value of EGFR downstream signaling phosphoprotein expression to KRAS status for response to anti-EGFR antibodies in colorectal cancer. Int J Cancer 2010; 127: 1321-1331.

13. Chergui F, Chretien AS, Bouali S et al. Validation of a phosphoprotein array assay for characterization of human tyrosine kinase receptor downstream signaling in breast cancer. Clin Chem. 2009; 55: 1327-1336.

14. Harrell FE, Jr., Lee KL, Mark DB. Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. Stat Med. 1996; 15: 361-387.

15. Sauerbrei W, Schumacher M. A bootstrap resampling procedure for model building: application to the Cox regression model. Stat Med. 1992; 11: 2093-2109.

16. Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A et al. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. Ann Oncol 2014; 2014.

17. Bokemeyer C, Van Cutsem E, Rougier P et al. Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. Eur J Cancer 2012; 48: 1466-1475.

18. Iwamoto S, Hazama S, Kato T et al. Multicenter phase II study of second-line cetuximab plus folinic acid/5-fluorouracil/irinotecan (FOLFIRI) in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: the FLIER study. Anticancer Res 2014; 34: 1967-1973.

19. Newbold R. Cancer: mutant ras proteins and cell transformation. Nature. 1984; 310: 628-629.

20. Razis E, Pentheroudakis G, Rigakos G et al. EGFR gene gain and PTEN protein expression are favorable prognostic factors in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. J Cancer Res Clin Oncol 2014; 140: 737-748.

21. Mirzoeva OK, Das D, Heiser LM et al. Basal subtype and MAPK/ERK kinase (MEK)-phosphoinositide 3-kinase feedback signaling determine susceptibility of breast cancer cells to MEK inhibition. Cancer Res. 2009; 69: 565-572.

22. Scartozzi M, Giampieri R, Maccaroni E et al. Phosphorylated AKT and MAPK expression in primary tumours and in corresponding metastases and clinical outcome in colorectal cancer patients receiving irinotecan-cetuximab. J Transl Med 2012; 10: 1479-5876.

23. Saglam O, Garrett CR, Boulware D et al. Activation of the serine/threonine protein kinase AKT during the progression of colorectal neoplasia. Clin Colorectal Cancer. 2007; 6: 652-656.

24. De Roock W, De Vriendt V, Normanno N et al. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. Lancet Oncol 2011; 12: 594-603.

25. Jeong WJ, Cha PH, Choi KY. Strategies to overcome resistance to epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy in metastatic colorectal cancer. World 2014; 20: 9862-9871.

26. Agarwal E, Chaudhuri A, Leiphrakpam PD et al. Akt inhibitor MK-2206 promotes anti-tumor activity and cell death by modulation of AIF and Ezrin in colorectal cancer. BMC Cancer 2014; 14: 1471-2407.

Table 1: Characteristics of patients analyzed for EGFR pathway protein by bioplex proteins assay.

Median Age	(Years ; range)	61 (22-80)
Gender	Male	58
	Female	41
	NA	1
Number of chemotherapy line used before anti-EGFR	0	0%
	1	5%
	2	46%
	3	36%
	4	8%
	5	3%
	6	2%
Death	Yes	83%
	No	17%
Median OS (month – range)	(month – range)	10.0 (0.1-48.1)
Median PFS (month – range)	(month – range)	4.1 (0-20.0)
Response	Complete Response	2%
	Partial response	26%
	Stable disease	34%
	Progressive disease	37%
	NA	1%
WHO	0	28%
	1	48%
	2	11%
	3	1%
	NA	12%
Mutation	KRAS	36%
	NRAS	4%
	BRAF	2%

Table 2 : Expression of phosphoproteins in all samples, RAS muted samples and RAS wild-type samples. Expression of pAKT, pERK1/2 and pMEK1 is significantly lower in *RAS* wild-type patients.

	All	***RAS* mutated**	***RAS* wild-type**	**p**
pAKT	104.01 ; 98.5 [86.04;124.55]	110.79 ; 109.46 [93.31;126.27]	99.49 ; 92.83 [82.10;122.07]	**0.0246**
pEGFR	139.35 ; 109.39 [86.69;141.04]	174.69 ; 105.38 [88.58;146.54]	115.80 ; 110.11 [85.16;139.13]	0.9355
pERK 1/2	245.73 ; 138.98 [101.59;263.85]	350.22 ; 178.23 [137.87;395.01]	176.07 ; 113.83 [92.04;169.58]	**0.0004**
pGSK3	133.03 ; 101.05 [66.38;183.82]	135.62 ; 97.79 [66.38;168.41]	131.30 ; 105.88 [65.32;184.71]	0.7676
pIGFR	83.65 ; 74.83 [64.29;96.68]	83.52 ; 70.81 [63.89;91.62]	83.74 ; 77.13 [64.70;101.09]	0.4024
pMEK1	272.19 ; 131.82 [80.42;280.74]	411.25 ; 209.52 [87.89;402.14]	179.48 ; 104.09 [77.70;201.28]	**0.0110**
pP70S6K	123.31 ; 112.49 [89.14;135.21]	131.39 ; 124.47 [93.58;136.83]	117.93 ; 105.24 [85.00;135.21]	0.1690
pP90SRK	74.37 ; 75.61 [49.71;95.38]	81.03 ; 80.27 [48.73;101.78]	69.93 ; 71.78 [50.11;88.26]	0.1303

*mean; median [lower quartile ; upper quartile]

Table 3 : Expression of phoshoproteins and response rate. Patients with expression of pAKT over 120 and pEGFR over 100 achieved significantly better response rate (a). These two phospohproteins remained statistically significant in multivariate analysis to predict response after bootstrap validation (b)

a)

pProt	AUC et IC95%	Threshold*	RC ou RP	p-value	OR and CI95%
pAKT	0.588 [0.436;0.74]	<120 >=120	36.36%(16) 68.75%(11)	**0,0258**	1 3.85[1.13;13.07]
pEGFR	0.634 [0.491;0.776]	<100 >=100	25.00%(5) 55.00%(22)	**0,0277**	1 3.67[1.12;12.03]
pERK1/2	0.497 [0.348;0.646]	<110 >=110	38.45%(10) 50.00%(17)	0,373	1 1.60[0.57;4.51]
pGSK3	0.504 [0.355;0.653]	<130 >=130	38.24%(13) 53.85%(14)	0,228	1 1.88[0.67;5.31]
pIGFR	0.513 [0.365;0.662]	<60 >=60	33.33%(3) 47.06%(24)	0,445	1 1.78[0.40;7.89]
pMEK1	0.497 [0.348;0.646]	<100 >=100	38.46%(10) 50.00%(17)	0,373	1 1.60[0.57;4.51]
pP70S6K	0.585 [0.439;0.731]	<105 >=105	36.67%(11) 53.33%(16)	0,194	1 1.97[0.70;5.54]
pP90SRK	0.577 [0.43;0.723]	<70 >=70	35.71%(10) 53.13%(17)	0,176	1 2.04[0.72;5.77]

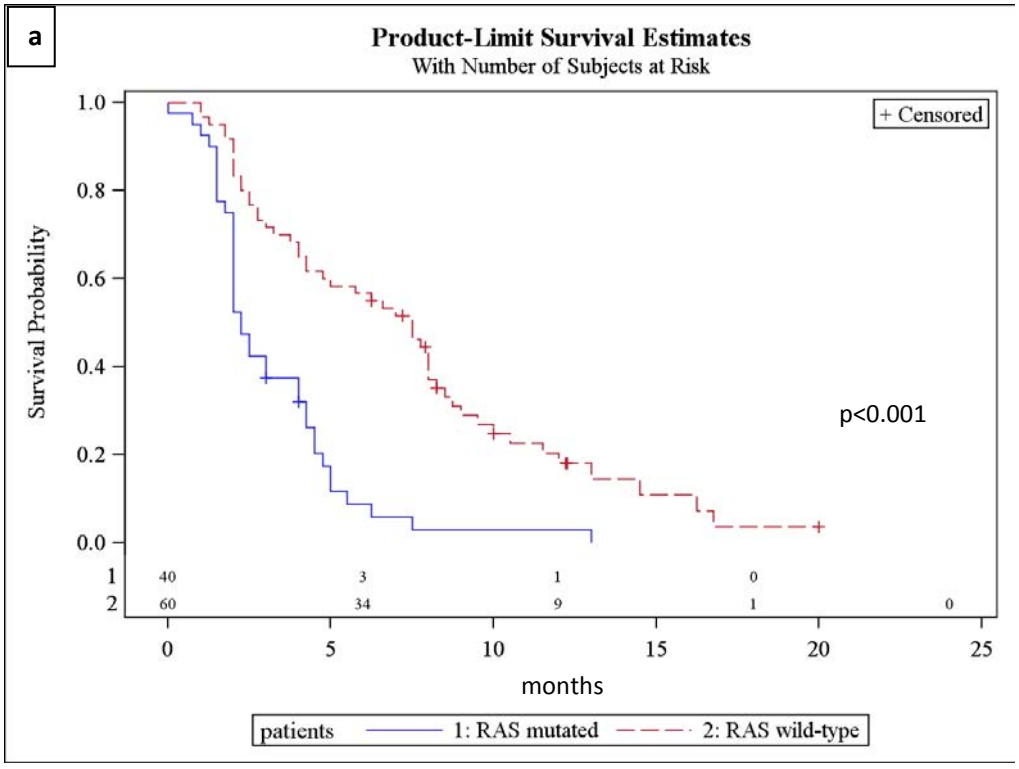
*Optimal threshold according to Youden index.

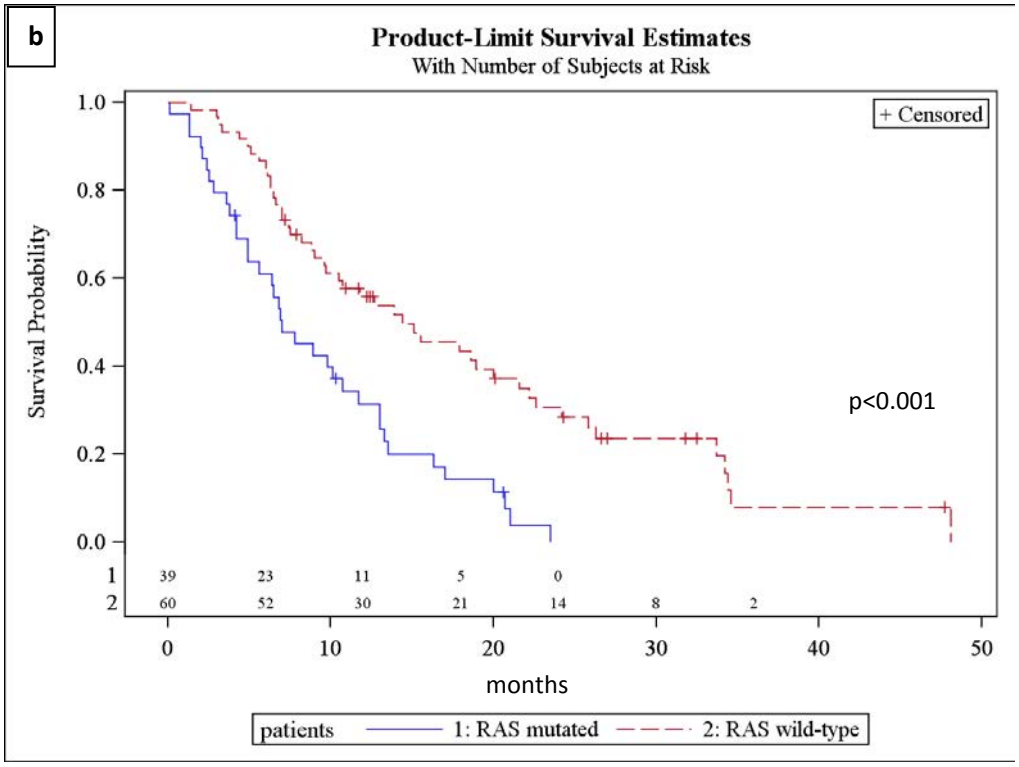
b)

MULTVARIATE

pProt	OR et IC35%
pAKT²	1 3.70[1.04;13.18]
pEGFR²	1 3.53[1.03;12.11]

Figure 1: Kaplan-Meier's curve of *RAS* wild-type and *RAS* mutated patients for PFS (a) and OS (b).





Chapitre V

Discussion Générale

V. Discussion générale

V.1. Biomarqueurs et Recherche translationnelle

La recherche translationnelle vise à améliorer la prise en charge des patients en essayant d'adapter directement les découvertes les plus récentes de la recherche fondamentale et en les transposant à la clinique. C'est le cas notamment dans le domaine des biomarqueurs de réponse aux thérapies ciblées en cancérologie. Durant les 10 dernières années, de nombreux biomarqueurs prédictifs de réponse ont été validés. C'est le cas, entre autres, des translocations *BCR-ABL* dans la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) pour la prescription de l'imatinib, le dasatinib ou du nilotinib (141, 142), ou encore des mutations *EGFR* dans les cancers bronchiques non à petites cellules pour l'utilisation du gefitnib ou de l'erlotinib (83, 143), les mutations V600 du gène *BRAF* pour le traitement par vémurafenib ou dabrafenib des mélanomes métastatiques (113, 144), de la surexpression de HER2 pour la prescription du trastuzumab, du pertuzumab ou du trastuzumab-emtansine dans les cancers du sein (86, 91, 145), ou encore, comme vu dans ce travail, des mutations des gènes *KRAS* et *NRAS* pour la prescription du cetuximab ou du panitumumab dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques (27, 29). La liste des biomarqueurs validés et obligatoires pour la prescription d'une thérapie ciblée apparait dans le

***Tableau* 3**.

Biomarqueurs	Molécules	Indications
Mutations de *KRAS* et *NRAS*	Cetuximab, Panitumumab	Cancer colorectal métastatique
Mutations V600 de *BRAF*	Vémurafenib, Dabrafenib	Mélanome métastatique
Mutations de *EGFR*	Erlotinib, Gefitinib	Cancer bronchique non à petites cellules
Mutation *KIT* et *PDGFR*	Imatinib	Tumeur stromale Gastro-intestinale
Surexpression du récepteur HER2	Trastuzumab, Pertuzumab, Trastuzumab Emtansine, Lapatinib	Cancer du sein métastatique
Translocations *de ALK*	Crizotinib	Cancer bronchique non à petites cellules
Translocations BCR-ABL	Imatinib, Nilotinib, Dasatinib	Leucémie Myéloïde Chronique, Leucémie Aigue Myéloïde Phi+

Tableau 3 Liste des biomarqueurs validés par l'Institut National du Cancer. La prescription des molécules est obligatoirement réalisée sur la base du résultat du test moléculaire.

Ces biomarqueurs validés constituent une avancée majeure pour le traitement de la maladie cancéreuse, mais ne sont malheureusement pas suffisants. La valeur prédictive négative de ces biomarqueurs est souvent très bonne. On sait par exemple que la quasi-totalité des patients dont les tumeurs présentent des mutations sur les exons 2, 3 ou 4 de *KRAS* ou *NRAS* ne recevront aucun bénéfice d'un traitement anti-EGFR. Cependant, chez les patients dont les tumeurs ne présentent pas de mutation sur ces gènes, la réponse reste modeste, de l'ordre de 40 à 60% (11). Cela met en évidence la mauvaise valeur prédictive positive de ce biomarqueur. Il est de ce fait extrêmement important de trouver d'autres biomarqueurs afin d'affiner la valeur prédictive positive.

Pour certaines thérapies ciblées comme les antiangiogéniques, il n'existe à ce jour aucun biomarqueur identifié, aussi bien de résistance que de réponse. De nombreuses équipes ont tenté de trouver un biomarqueur pour prédire la réponse ou la résistance au bevacizumab chez les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique. C'est le cas par exemple de l'utilisation du Carbohydrate Hydrogen 19-9 (CA 19-9) qui, chez les patients où il est le moins exprimé au temps zéro (t_0) de l'étude, prédit une médiane de survie globale plus élevée que le groupe le surexprime à t_0 (27,8 vs 15,3 mois ; p=0,0019) (146). Cependant, cette étude est rétrospective et fait appel à 252

patients qui, en fonction du taux initial de CA 19, ont été divisés en deux groupes établis selon un seuil calculé rétrospectivement de manière statistique. La validité de ce seuil statistique devra toutefois être contrôlé prospectivement. Le VEGF-A circulant a également été considéré comme biomarqueur prédictif de réponse au bevacizumab (147). Cette étude conclut en l'intérêt potentiel du VEGF-A comme marqueur pronostique sur tous les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique, mais précise qu'il ne constitue pas un marqueur prédictif de réponse au bevacizumab. La survenue d'une hypertension chez les patients traités par bevacizumab a été reconnue comme un marqueur prédictif de réponse (148). Les patients chez lesquels une hypertension survient lors d'un traitement par bevacizumab ont une survie sans progression et une survie globale significativement meilleures par rapport aux patients ne présentant pas d'hypertension (HR = 0,57, 95% CI: 0.46-0.72; p<0,001 et HR = 0,50; 95% CI: 0.37-0.68; p<0,001 respectivement). Cependant, la survenue d'une hypertension est un signe clinique pouvant être observé après l'administration du bevacizumab, et ne peut pas être prédit. Enfin les derniers articles publiés sur la recherche de biomarqueurs prédictifs de réponse aux traitement antiangiogéniques dans les cancers colorectaux métastatiques étudient l'intérêt des micro-ARNs (149). C'est le cas notamment avec un article émettant l'hypothèse de l'intérêt de miR126 associé à EGFL7 (Epidermal Growth Factor-Like domain 7) dans la prédiction de la réponse aux traitements à base de bevacizumab (150). Là aussi, les auteurs mettent en évidence des relations probables entre les différents taux de EGFL7, la présence de miR126 et la présence ou non de mutations de *RAS*, mais leurs résultats sont à la limite de la significativité pour prédire la survie sans progression.

Les nouvelles approches en cancérologie tendent à supprimer la notion de maladie d'organe et de ne considérer que le statut moléculaire. C'est le cas par exemple d'essais cliniques actuellement en cours. L'essai AcSé (Accès Sécurisé aux thérapeutiques innovantes), vise par exemple à étudier l'utilisation du vémurafenib chez les patients atteints d'un cancer quelque soit l'organe, et o condition que l'ADN tumoral présente une mutation V600 sur le gène *BRAF*. Le même essai est décliné pour l'utilisation du crizotinib chez les patients dont les tumeurs présentant des

translocations du gène *ALK* ou des mutations du gène *MET*. Les résultats de ces essais permettront de savoir si les cliniciens pourront se contenter à l'avenir d'une carte génétique caractérisant le cancer avec en face de chaque anomalie une alternative thérapeutique ciblée ou si l'approche par organe reste nécessaire. D'autres essais cliniques utilisant le même principe sont en cours. Dans certains centres de lutte contre le cancer, des réunions de concertations pluridisciplinaires moléculaires, « RCP moléculaires » sont déjà en place. Ces RCP moléculaires visent à faire bénéficier aux patients ayant épuisé les lignes thérapeutiques disponibles d'un génotypage selon un panel préétabli et de leur administrer la thérapie ciblée correspondante. Le recul étant faible, il est difficile aujourd'hui de déterminer le réel impact bénéfique ou non de ces traitements sur les patients.

V.2. Discussion sur le travail de thèse et applications cliniques des résultats

Les trois objectifs principaux de ce travail étaient de mettre au point et d'optimiser des techniques de biologie moléculaire pour la détermination des statuts mutationnels de gènes d'intérêt d'une part, de valider ces techniques pour être en conformité avec la législation en vigueur et enfin d'appliquer ces techniques à la recherche de biomarqueurs prédictifs de réponse chez des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique et traités par anti-EGFR.

Les techniques d'analyse des mutations de *RAS* et *PIK3CA* reposent essentiellement sur de la PCR en temps-réel. Il est important de noter que la sensibilité analytique de ces techniques peuvent avoir un impact considérable sur la prise en charge médicamenteuse des patients. En effet, en cas de sensibilité trop faible, un échantillon peut être interprété comme « sauvage » alors qu'en réalité il présente un faible taux de cellules portant la mutation (122). Les techniques utilisées lors de notre étude ont une sensibilité analytique de l'ordre de 1 à 10% selon le type de technique et selon le type de mutation recherché, ce qui laisse penser de façon raisonnable que le taux de faux négatifs reste

faible. Cependant, aucune étude à ce jour n'a déterminé si la présence d'une mutation dans une proportion très faible pouvait avoir un impact sur la réponse au traitement. Par exemple, si une cellule sur 100 000 présente une mutation de *RAS*, alors le patient ne bénéficierait-t-il pas de l'action d'un anti-EGFR pour les 99 999 cellules ne présentant pas l'altération moléculaire ? Observerait-on un phénomène de sélection clonale comme cela est décrit dans les modèles Darwiniens (151) ? D'autre part, certaines des techniques utilisées sont spécifiques d'allèles et d'autres non spécifiques. Chaque technique présente des avantages et des inconvénients. Les techniques spécifiques d'allèles comme la PCR TaqMan ou la PCR ARMS sont souvent plus sensibles et permettent de déterminer la présence de mutations déjà décrites *via* des sondes spécifiques de ces mutations. La plupart du temps, les sondes utilisées dans ces techniques sont fabriquées à partir des données de la littérature et en fonction des fréquences les plus élevées de mutations rencontrées. Si toutefois la mutation présente sur le gène ne fait pas partie des mutations recherchées par ces sondes spécifiques, alors l'échantillon sera considéré comme ne présentant pas de mutation (152). Dans le cas des techniques non spécifiques comme la PCR HRM, la sensibilité est souvent moins bonne que celle des techniques spécifiques, mais ces techniques permettent de screener la totalité d'un exon par exemple. Par conséquent, toute mutation présente sur l'exon sera détectée et ce quelque soit le type de mutation. Les mutations ne pouvant pas être caractérisées avec ces techniques non spécifiques, une mutation silencieuse est détectée au même titre qu'une mutation activatrice, ce qui pose le problème de l'utilisation de thérapies ciblées pour ces patients. En cas de substitution d'un nucléotide mais qui ne modifie pas l'acide aminé résultant lors de la traduction, la méthode de PCR non spécifique donnera l'information « présence d'une mutation », ce qui contre-indiquera par exemple la prescription d'un anti-EGFR, alors que la protéine KRAS restera normalement fonctionnelle chez le patient. Par conséquent, avec ce type d'approche, le risque de « faux positif » dans le sens « présence d'une mutation ne contre-indiquant pas l'utilisation d'un anti-EGFR » est possible. Compte tenu des avantages et inconvénients de chaque méthode, la technique idéale devrait être sensible, spécifique, mais aussi compatible avec la routine et les délais de mise sous traitement. Aujourd'hui, seules les

techniques de séquençage à haut-débit permettent de réunir toutes ces qualités, à l'exception de la mise en œuvre qui est souvent lourde et qui par conséquent se répercute sur les délais de rendu des résultats aux cliniciens, mais aussi un coût élevé par échantillon. Une solution intermédiaire peut cependant être trouvée en utilisant une technique non spécifique afin de screener les tumeurs pouvant présenter des mutations, puis une méthode spécifique plus sensible pour identifier les mutations. Ce workflow est décrit dans la ***Figure 13***. Cependant, par exemple, dans la recherche de mutations du gène *EGFR* dans les cancers du poumon pour la prescription du gefitinib ou de l'erlotinib, la caractérisation des mutations d'emblée est importante. En effet, certaines mutations du gène *EGFR*, comme par exemple la mutation T790M sont reconnues comme étant des marqueurs prédictifs de résistance à ces thérapies ciblées (153), tandis que les autres mutations, comme les L858R, sont des marqueurs prédictifs de réponse. Il n'existe donc pas de solution idéale à ce jour.

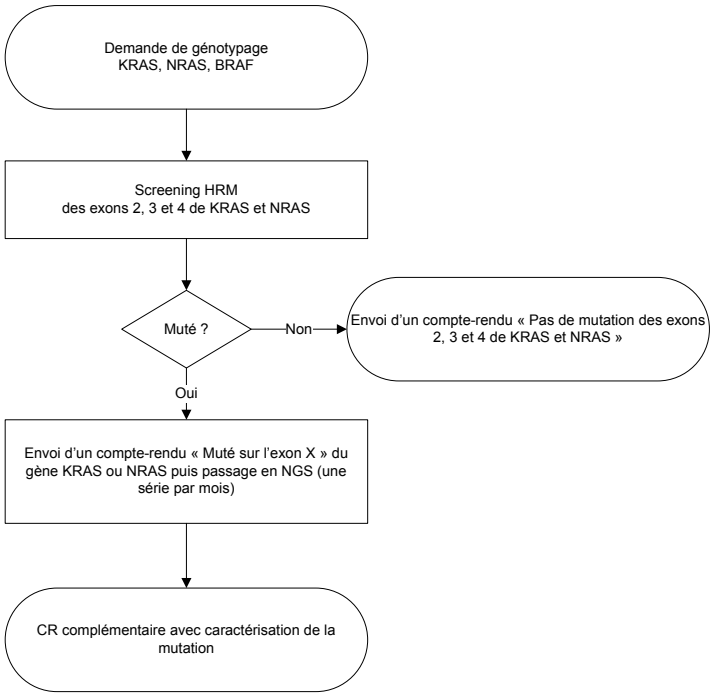


Figure 13 Proposition de workflow pour l'organisation des plateformes de génétique moléculaire réalisant des génotypages de *RAS*. L'utilisation d'une technique non spécifique comme la PCR HRM permet d'obtenir le résultat « muté » ou « non muté » de manière peu coûteuse et rapide, puis dans un second temps, le séquençage haut débit permet de caractériser les mutations détectées dans la première étape et de prévenir les cliniciens en cas de mutation silencieuse par exemple.

La validation des techniques de biologie moléculaire selon les exigences de la norme ISO 15 189 est possible, cependant des adaptations de la méthodologie proposée par le COFRAC dans le SH GTA-04 sont nécessaires. En effet, le guide de validation du COFRAC est clairement adapté à la biologie médicale de routine et très peu adapté à la biologie moléculaire. En particulier, la rareté des échantillons et le coût des examens ne permettent pas de suivre à la lettre le SH GTA-04. Par exemple, il est recommandé par le COFRAC pour les essais de répétabilité ou de reproductibilité de passer au moins 30 fois un échantillon de 5 concentrations différentes. Cela n'est clairement pas réalisable dans le cadre d'analyse d'ADN, la quantité extraite depuis une biopsie étant parfois très faible et ne suffit parfois pas à la réalisation des examens prescrits. L'autre difficulté de la validation des méthodes de biologie moléculaire réside dans le peu de littérature consacrée aux validations de méthode. Aujourd'hui en France, seules 28 plateformes de biologie moléculaire sont habilitées par l'INCa à réaliser des génotypages dans le cadre de la recherche de biomarqueurs. Cela explique en grande partie le peu de données disponibles sur le sujet.

Le dernier objectif de ce travail concernait l'étude de l'expression des phosphoprotéines dans des tumeurs de patients atteints d'un cancer colorectal métastatique. Dans la population étudiée, le nombre de patient était de 100. Parmi ces 100 patients, 60 ne présentaient pas de mutations des gènes *KRAS* et *NRAS*. Sur la population globale, il a été retrouvé, comme décrit dans la littérature, une tendance à la surexpression des phosphoprotéines chez les patients dont les tumeurs présentaient des mutations et à l'inverse une moindre expression des phosphoprotéines chez les patients dont les tumeurs étaient wild-type. De même, la population étudiée possédait les mêmes caractéristiques concernant la réponse aux anti-EGFR pour les patients dont les tumeurs ne présentaient pas de mutation de *RAS*. Nous avons retrouvé une expression significativement plus importante de pEGFR et de pAKT chez les patients présentant une meilleure réponse au traitement et dont les tumeurs étaient wild-type. La surexpression de pEGFR a déjà été décrite comme un marqueur prédictif de réponse aux anti-EGFR, mais l'expression de pAKT au contraire est souvent associées à une diminution du taux de réponse, de la survie sans progression et de la survie globale.

De plus, dans notre population, aucune relation significative n'a été retrouvée entre l'expression de pMEK et de pP70S6K chez les patients dont les tumeurs ne présentaient pas de mutations de *RAS* et traités par anti-EGFR. Cela va à l'encontre des résultats publiés par le laboratoire en 2010 (129). Cette différence peut s'expliquer par la taille de la population analysée tout d'abord. L'étude préliminaire ne comptait que 42 patients tandis que l'étude décrite ici repose sur l'analyse de 100 patients. Cependant d'autres paramètres rentrent nécessairement en compte. Tout d'abord les prélèvements tumoraux réalisés ont été congelés directement à -80°C, mais aucune information n'était disponible sur les durées d'ischémie chaude et froide. Les phosphoprotéines étant fragiles, le temps entre le début de l'intervention chirurgicale et la fin, et le temps de transport du préleveur au laboratoire pour congélation est une donnée importante. Dans notre étude, ces délais ne sont malheureusement pas recueillis. Les durées d'ischémie chaude et froide ont un impact direct sur la qualité des analytes lorsque ceux-ci sont fragiles, comme c'est le cas pour les phosphoprotéines (154). Ainsi, toute la phase pré-analytique n'est pas totalement maitrisée dans cette étude. L'utilisation de fixateurs comme le RCL2, permettant de mieux conserver les ARNm et les phosphoprotéines peuvent être utilisés. En utilisant ce type de fixateur, le temps d'ischémie chaude resterait inchangé, mais la durée d'ischémie froide pourrait être quasi nulle si les chirurgiens préleveurs placent directement au bloc le prélèvement dans un flacon contenant du RCL2 (données en cours de publication). D'autre part le pourcentage de cellules tumorales a été déterminé, mais il est connu que cette évaluation est difficile et peu reproductible. De plus, la masse de la biopsie effectuée n'est pas standardisée. Par conséquent, compte tenu de ces deux éléments, il existe un biais puisque le nombre de cellules analysées n'est probablement pas le même d'un échantillon à l'autre. La biopsie qui a été analysée a été faite généralement sur un endroit accessible de la tumeur. Il se pose alors la question de savoir si la zone biopsiée est bien représentative de la tumeur. Les résultats de cette étude sont aussi discutés par rapport à la technique d'analyse utilisée. Le Bioplex® permet une analyse quantitative, mais ne possède pas de témoins interne. Par conséquent, une moyenne des valeurs des échantillons analysés est utilisée pour déterminer une expression de base.

Ce problème est rencontré également dans les technique de Western Blot et d'immunohistochimie. Cependant, cette dernière technique, bien que semi-quantitative, et reposant sur la détermination d'un score par le médecin anatomopathologiste, permet de déterminer si la surexpression de la phosphoprotéine est plutôt nucléaire ou cytoplasmique. En technique Bioplex®, c'est un lysat tumoral qui est analysé, il n'est donc pas possible de différencier l'activité selon la localisation dans la cellule ou dans le tissu. Enfin, il est important de considérer l'hétérogénéité tumorale. Ainsi, l'étude de West N.P. *et al.* démontre clairement à travers l'étude de prélèvements obtenus de patients atteints de cancers colorectaux, que la répartition des cellules tumorales dans l'échantillon est assez hétérogène et est une source importante de variabilité, notamment de part la présence de stroma en quantité variable dans le tissu tumoral (155) - ***Figure 14***.

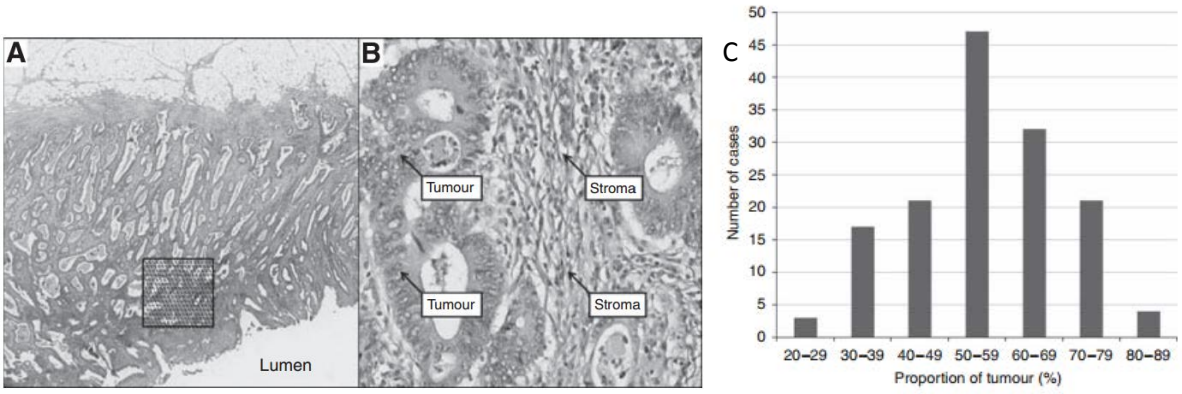


Figure 14 Illustration de l'hétérogénéité tumorale sur une coupe HES d'un prélèvement de cancer colorectal (A). La quantité de stroma varie de manière considérable d'un échantillon à l'autre lorsque l'on considère des points précis de la coupe (B), rendant difficile l'évaluation de la quantité de cellules tumorales dans un échantillon (C). D'après West N.P. et *al.* (155)

L'hétérogénéité tumorale peut être microscopique comme précédemment cité, mais aussi au niveau moléculaire. De plus en plus d'études décrivent la présence de mutations différentes au sein de la même tumeur, comme par exemple la présence de deux mutations différentes sur le codon 12 du gène *KRAS* (156). Au laboratoire, plusieurs cas de patients présentant à la fois des mutations du gène *KRAS* et *NRAS* ont déjà été rencontrés, ainsi que des patients présentant des doubles mutations du codon 12 de *KRAS* (données non publiées). Ainsi, en considérant la possible présence de différents

clones de cellules tumorales présentant des mutations de différentes sortes ou de clones ne présentant pas de mutation, il semble difficile de prédire au niveau de la signalisation cellulaire les expressions des phosphoprotéines dans chacune des cellules. Par conséquent, en mesurant l'ensemble de l'activité dans la tumeur, la surexpression de phosphoprotéines due à une mutation particulière pourrait très bien être « nivelée » par les niveaux d'expression mesurées dans des cellules ne présentant pas les mêmes caractéristiques moléculaires.

V.3. Les autres voies de signalisation à considérer

Dans notre étude, nous avons essentiellement considéré les voies de signalisation RAS/RAF/MAPKinases et PI3K/AKT/mTOR. De nombreuses études font état de l'importance d'autres voies mises en jeu dans les cancers colorectaux métastatiques. C'est le cas notamment de la voie des WNT, la voie des STAT et de la voie P38MAPK.

V.3.1. La voie des WNT

Aussi appelée voie des β-caténines, la voie WNT est impliquée dans de nombreux processus importants dont l'embryogenèse, mais également dans l'homéostasie intestinale. Des messages protéiques appelés WNT vont activer les récepteurs *Frizzled* (FZD) pour induire la stabilisation de la β-caténine, protéine impliquée dans les liaisons inter-membranaires, sous sa forme cytoplasmique (47). La surexpression de WNT2 dans les cancers colorectaux est connue depuis 1996 (157), cependant, les retentissements cliniques et pronostiques de la surexpression ou de l'absence d'expression des acteurs de la voie WNT ne sont connus que depuis peu de temps. Par exemple, la diminution de l'expression de WNT5a dans les cancers colorectaux est synonyme d'agressivité

tumorale, *WNT5a* agissant comme un gène suppresseur de tumeur (158). Dans les cancers colorectaux, de nombreuses mutations sont retrouvées au niveau tumoral touchant la voie WNT. Cette voie étant au centre de la carcinogenèse, il semble que les protéines intervenant dans ces cascades de signalisation soient de bonnes candidates à la mise au point de thérapeutiques ciblées (159).

V.3.2. La voie STAT

La voie STAT, ou JAK/STAT/SOCS3 est activée par de nombreuses cytokines comme l'Interleukine 6 (IL-6), l'interleukine 15 (IL-15), mais aussi par le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) (160). Cette voie fait intervenir les protéines JAK (JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2) qui sont des protéines intra-cytoplasmiques à activité tyrosine kinase. L'activation de JAK va permettre la phosphorylation des protéines STAT qui vont alors être responsables *via* la production de protéines inhibitrices comme SOCS3 de contrôler la prolifération, la croissance, la division ou encore le développement cellulaire.

Dans les cancers colorectaux, cette voie montre de plus en plus son intérêt. Tout d'abord, il semblerait que l'expression de STAT1 et STAT3 soient des marqueurs pronostiques favorables (161). D'autre part, cette voie semble être une piste intéressante pour le développement de nouvelles thérapies ciblées. C'est le cas par exemple d'un inhibiteur de HSP90, le ganetespib, dont l'activité antiangiogénique est régulée par HIF-1α et STAT-3 (162). Enfin, il semblerait que cette voie soit responsable, après activation par l'IL-23, d'augmenter le potentiel métastatique des tumeurs en diminuant l'action de SOCS3 (163). Des inhibiteurs de JAK comme AZD1480 sont également en essai actuellement. Cette molécule agit notamment en inhibant la voie JAK2/STAT3 (164).

Ainsi, cette l'étude de cette voie de signalisation semble très prometteuse pour la détermination de nouvelles cibles thérapeutiques et la recherche de nouveaux biomarqueurs dans les cancers colorectaux métastatiques.

V.3.3. P38MAPK

La P38MAPkinase appartient à la famille des MAPKinases. La famille P38 est constituée de quatre membres présentant une homologie de 60%, p38α, p38β, p38γ et p38δ. P38α est l'isoforme le mieux caractérisé et à priori le plus abondant car exprimé dans la plupart des types cellulaires (165). Ces kinases jouent un rôle dans la régulation de la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que dans le contrôle de l'apoptose.

Nous avons démontré au laboratoire que l'activation de P38MAPK est retrouvée dans certains cancers du sein - ***Annexe 1***. Cette piste est également exploitable dans les cancers colorectaux. Il a notamment été démontré que dans cette pathologie, P38MAPK était un facteur clé de la régulation entre autophagie et apoptose au niveau cellulaire (166). De plus, il a été démontré l'existence d'un crosstalk entre KRAS et P38. Dans les tumeurs, la présence d'une mutation activatrice activerait en permanence P38, ce qui permettrait à la cellule cancéreuse de maintenir un fort pouvoir de prolifération, notamment lors de l'utilisation de molécules anti-MEK (167). Le blocage de ce crosstalk est possible en inhibant P38α, ce qui provoque une augmentation de la caspase 8 médiée par TRAIL, ainsi qu'une régulation positive de HER3 dépendant de FOXO3A avec des conséquences sur la suractivation de la voie de signalisation de survie MEK-ERK1/2 (168). Ainsi, le double blocage de P38α et de MEK pourrait constituer une bonne stratégie thérapeutique dans le traitement des cancers colorectaux, avec comme prérequis à cette thérapie une surexpression de P38α et de MEK.

V.4. Les nouveaux biomarqueurs

Dans ce travail, afin d'étudier les mutations somatiques et l'expression de phosphoprotéines, nous avons utilisé du matériel tumoral, soit sous forme de tissu fixé au formol et inclus en paraffine, soit à partir de tissu tumoral congelé. Les prélèvements utilisés étaient soit des biopsies, soit des pièces d'exérèse. Dans certains cas, il est très difficile d'obtenir du matériel tumoral (tumeur non accessible à la biopsie, tumeur non opérable, tumeur irradiée, ...). Le développement des techniques de biologie moléculaire permettent aujourd'hui quasiment d'obtenir les mêmes informations à partir d'un prélèvement sanguin ; c'est le concept de biopsie liquide.

V.4.1. ADN tumoral circulant

Les cellules tumorales en mourant libèrent dans la circulation sanguine et lymphatique des fragments de leur ADN. Cet ADN libre tumoral ou ADN tumoral circulant (ctDNA) devient ainsi détectable dans les fluides grâce à des techniques de haute sensibilité. Il a été démontré dès 2002 que la détection au niveau sanguin de ctDNA chez les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique était un facteur de mauvais pronostic avec notamment une augmentation du risque de récurrence (169). Les techniques de haute sensibilité ont permis quelques années plus tard de démontrer l'intérêt de la détection de ctDNA dans le suivi de la maladie cancéreuse. Dans les cancers colorectaux métastatiques, le suivi des copies de ctDNA détectées permet d'évaluer si le protocole de chimiothérapie reste efficace ou non et de prédire la survenue d'une résistance aux traitements (170). Enfin, de plus en plus d'études ont montré que les mutations retrouvées au niveau du ctDNA se retrouvaient au niveau de la tumeur primitive. Par conséquent, il sera bientôt possible d'utiliser les caractéristiques du ctDNA et éviter les biopsies ou la chirurgie pour déterminer les statuts mutationnels des gènes d'intérêt (171).

V.4.2. Cellules tumorales circulantes

Lors du développement des tumeurs, il arrive fréquemment que des cellules tumorales soient relarguées dans la circulation générale. Les nouvelles techniques de biologie moléculaire permettent aujourd'hui de compter et d'isoler ces cellules tumorales circulantes (CTC) pour les étudier. Dans une étude publiée en août 2014, Kalikaki *et al.* proposent par exemple l'isolement des CTC et l'étude de leur statut *KRAS* au cours de l'évolution de la maladie comme futur marqueur de réponse et de suivi des traitements (172). D'autres auteurs proposent même la notion, empruntée au domaine de l'hématologie, de maladie résiduelle basée sur l'étude des CTC, afin de suivre les patients atteints d'un cancer colorectal après une première rémission de leur maladie (173).

V.4.3. Les microARNs

Enfin, les micro ARN ou miR semblent être des biomarqueurs candidats extrêmement importants. Les miR sont des ARN non codants de petite taille et dont le rôle est avant tout la régulation de phénomènes biologiques. Dans les cancers colorectaux, de nombreux miR ont été décrits avec à chaque fois des propriétés extrêmement intéressantes. On peut citer par exemple miR-100 qui semble être un marqueur lié à la progression de la maladie et à un mauvais pronostic (174). Il semble que les miR soient également de bons candidats biomarqueurs dans les cancers colorectaux pour prédire la réponse aux chimiothérapies à base de 5-FU pour miR-107 et miR-99a-3p (175). Un article récent d'une équipe Française a également montré que l'expression de Hsa-miR-31-3p, un micro ARN responsable de la régulation de 47 gènes, permet de prédire la réponse aux traitements par anti-EGFR chez les patients dont les tumeurs sont *RAS* wild-type (176).

V.5. Evolution des techniques en biologie moléculaire

En 1990 a été lancé le *Human genome project*. Ce projet visait à séquencer l'intégralité du génome humain. C'est en 2003 que la fin du projet a officiellement été annoncée. Ce projet aura duré 13 ans et coûté plus de 2,7 milliards de dollars Américains. En 2014, la société Illumina propose le séquençage du génome pour 1000$ US en moins de 3 jours. Cet exemple est représentatif des progrès techniques réalisés dans le domaine de la biologie moléculaire.

Il est aujourd'hui possible à la plupart des laboratoires de biologie moléculaire d'acquérir un séquenceur de nouvelle génération permettant le séquençage à haut-débit. Cette évolution majeure a révolutionné l'approche en génomique tumorale et a permis un développement sans précédent des connaissances dans le domaine de la génétique (177). La quantité de données ajoutées dans les bases de données d'ADN sont représentées dans la ***Figure 15***.

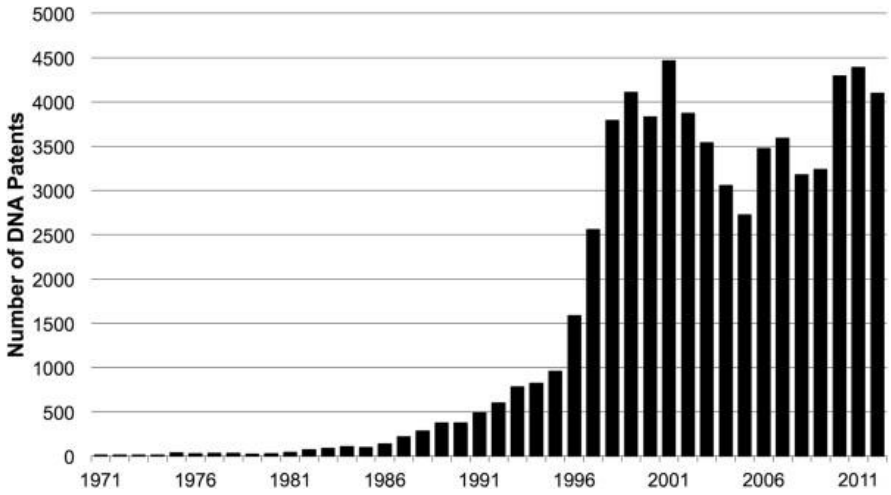


Figure 15 Informations concernant l'ADN, ajoutées chaque année dans les bases de données mondiales entre 1971 et 2011. Le développement des technologies de séquençage a provoqué une véritable explosion de la quantité de données disponibles dans les bases. D'après Wiechers *et al.* (177)

Différentes technologies de séquençage de nouvelle génération sont disponibles sur le marché actuellement. Les technologies les plus répandues aujourd'hui sont le pyroséquençage (technologie Flex 454 de Roche Diagnostics), la bridge PCR (technologie Ion Torrent de Life Technologies) et la PCR

en émulsion/ligation (technologie MiSeq de Illumina). Ces technologies présentent de nombreux avantages par rapport à la technique « historique » de Sanger. Cependant, le haut débit de ces machines peut parfois poser des soucis d'interprétation et le recours à un bioinformaticien est souvent nécessaire. Il est parfois difficile de faire la différence entre présence d'un variant minoritaire et artefact de séquençage dû, par exemple, à la technologie utilisée ou une erreur de la polymérase lors de la PCR. Les séquenceurs de troisième génération permettront le séquençage sans amplification, ce qui devrait permettre de résoudre ces problèmes. Un exemple d'application directe dans le domaine des biomarqueurs prédictifs de réponse dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques est l'utilisation du système GS Junior de Roche Diagnostics au laboratoire pour la détermination des séquences des gènes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *ALK* et *MET* à partir de fragments tumoraux fixés au formol et inclus en paraffine (données en cours de publication). Les technologies de très haut débit comme la technologie Illumina permettent également l'analyse de l'expression des micros ARNs dans les tissus ou les échantillons sanguins (178, 179).

Les techniques de PCR en temps-réel ont également considérablement évolué au cours des dernières années. L'utilisation de techniques comme la digital PCR, la droplet PCR, le beaming, la technologie IntPlex® ou encore la technologie RainDance® permettent désormais de détecter une copie mutée sur 10 000 copies non mutées. Ces techniques ont notamment un intérêt dans l'analyse de l'ADN tumoral circulant. Les différentes approches techniques pour l'analyse de l'ADN tumoral circulant ont fait l'objet d'un chapitre dans le livre édité aux éditions Springer Paris, « Les biomarqueurs moléculaires en oncologie », Pr. JL Merlin – ***Annexe 2***.

Enfin, de nombreux progrès ont permis également de mieux isoler et étudier les cellules tumorales circulantes. C'est le cas notamment de la technologie DEPArray™ qui permet d'isoler une cellule d'intérêt, comme par exemple une cellule tumorale circulante, sur un prélèvement de sang standard contenant plusieurs milliers de cellules (180).

Toutes ces nouvelles techniques contribuent évidemment à augmenter les chances de découverte de biomarqueurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées quelque soit la pathologie cancéreuse concernée.

Conclusion

Les thérapies ciblées sont une évolution majeure pour le traitement des patients atteints de cancers. Dans des pathologies comme la LMC, l'utilisation de thérapies ciblées a permis de modifier complètement le pronostic de la maladie permettant de passer d'un pronostic très sombre à une maladie plus chronique avec des survies à 5 ans supérieures à 90%. Dans le traitement des tumeurs solides, les thérapies ciblées ont permis des avancées un peu moins spectaculaires, mais tout de même remarquables. Ainsi, que ce soit dans le traitement des cancers du sein métastatiques, des mélanomes métastatiques, des cancers bronchiques non à petites cellules, des tumeurs stromales gastro-intestinales ou comme dans ce travail, des cancers colorectaux métastatiques, l'identification des mécanismes moléculaires a permis d'identifier une cible exprimée de manière préférentielle par la cellule cancéreuse, permettant ainsi son ciblage et permettant dans tous les cas d'obtenir des taux de réponse supérieurs à la chimiothérapie conventionnelle.

La découverte de biomarqueurs prédictifs de réponse à une thérapeutique ciblée est essentielle. Cependant il est important de noter que les valeurs prédictives négatives de ces biomarqueurs sont souvent très bonnes alors que les valeurs prédictives positives le sont souvent beaucoup moins. C'est le cas par exemple des cancers colorectaux pour lesquels la présence de mutation des gènes *KRAS* ou *NRAS* signifie presque à 100% une absence de réponse aux anti-EGFR, alors que l'absence de mutation sur ces mêmes gènes ne garantit pas pour autant une réponse. En effet, comme précédemment cité dans ce travail, les patients *RAS* wild-type atteints d'un cancer colorectal métastatique et traités par un anti-EGFR en association à une chimiothérapie ne répondent au traitement que dans 40 à 60% des cas. Il est donc important de garder à l'esprit qu'il existe encore des mécanismes influençant la réponse non élucidés, et qu'à ce jour en cancérologie, il n'existe pas de biomarqueur prédictif de réponse à une thérapie ciblée permettant de prédire un succès dans 100% des cas. D'autre part, certaines thérapies ciblées, comme les traitements antiangiogéniques, sont toujours orphelines de biomarqueurs prédictifs de réponse.

L'évolution exponentielle des technologies disponibles en biologie moléculaire permettent aujourd'hui aux chercheurs du monde entier de mieux appréhender les mécanismes de la maladie cancéreuse, mais aussi de comprendre l'immense complexité de ce qu'il reste encore à découvrir. Le séquençage haut débit ou ultra-haut débit, l'analyse des cellules tumorales circulantes ou encore l'amélioration des techniques de PCR et de séquençage permettant d'obtenir la sensibilité suffisante pour l'analyse d'ADN tumoral circulant, sont des avancées technologiques majeures qui ouvrent des perspectives gigantesques aussi bien en recherche fondamentale qu'en clinique pouvant générer des changements radicaux de prise en charge, par exemple avec l'arrivée imminente des biopsies liquides dans le diagnostic, le pronostic ou le suivi de la maladie cancéreuse.

Dans ce travail, nous avons réalisé trois objectifs : nous avons déterminé et validé des techniques de biologie moléculaire afin de permettre l'analyse fiable et répétable de mutations présentes sur des gènes d'intérêt. Puis nous avons validé ces techniques selon les normes imposées par la législation Française afin de les rendre disponibles en routine et de permettre leur utilisation tout en respectant les exigences imposées par la norme ISO 15 189. Enfin, nous avons étudié l'expression des principales phosphoprotéines impliquées dans les voies de signalisation en aval des récepteurs à l'EGF, puis confronté les niveaux d'expressions à la génomique d'une part et à la clinique d'autre part. Ce travail de recherche translationnelle vise à permettre de mieux cibler les patients qui pourraient bénéficier d'un traitement anti-EGFR et limiter les échecs de traitement pour les patients dont la tumeur ne présente pas de mutation sur les gènes *KRAS* et *NRAS*. Les résultats finaux mettent le doigt sur la complexité des mécanismes en aval et des nombreuses investigations nécessaires pour pouvoir améliorer la valeur prédictive positive des biomarqueurs dans le cancer colorectal métastatique traités par anti-EGFR.

La recherche translationnelle a pour vocation de permettre un transfert plus simple des applications de la recherche fondamentale vers la clinique, « from bench to bedside ». En cancérologie, la découverte de biomarqueurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées a amélioré de façon

considérable le pronostic des patients atteints de cancers. Cependant les nouvelles technologies aidant, force est de constater l'immense complexité de la pathologie cancéreuse et force est de réaliser que nous ne voyions jusqu'à présent que la partie émergée d'un iceberg. Les récentes découvertes en génomique, en transcriptomique, en protéomique, en épigénétique, ou encore en immunologie, illustrent parfaitement la pluridisciplinarité requise pour peut-être un jour pouvoir mieux appréhender les mécanismes impliqués dans la maladie cancéreuse. Les collaborations interdisciplinaires sont plus que jamais une nécessité pour espérer un jour pouvoir guérir totalement les patients atteints de cancers.

Annexes

Annexe 1 : Expression and activation of P38 MAP kinase in invasive ductal breast cancers : Correlation with expression of the estrogen receptor, HER2 ans downstream signaling phosphorylated proteins

ONCOLOGY REPORTS

Expression and activation of P38 MAP kinase in invasive ductal breast cancers: Correlation with expression of the estrogen receptor, HER2 and downstream signaling phosphorylated proteins

JEAN-LOUIS MERLIN[1,2,3], ALEXANDRE HARLÉ[1,2,3], MAËVA LION[1,2,3], CAROLE RAMACCI[1] and AGNÈS LEROUX[1,3]

[1]Department of Biopathology, Institut de Cancérologie de Lorraine, 54519 Vandoeuvre les Nancy;
[2]Université de Lorraine, Faculty of Pharmacy, 54001 Nancy;
[3]CNRS UMR 7039 CRAN, 54506 Vandoeuvre les Nancy, France

Received May 29, 2013; Accepted June 28, 2013

DOI: 10.3892/or.2013.2645

Abstract. MAP kinase signaling proteins have major implications in the molecular oncogenesis of breast cancers and have been extensively investigated as putative targets for therapy. This study reports the investigation of the expression of P38 MAPK and its phosphorylated form (p-P38 MAPK) in clinical specimens of invasive breast carcinomas and their correlation with estrogen receptor (ER) and HER2 expression, as well as MAPK and PI3 kinase-AKT pathway signaling phosphorylated proteins. Expression levels of P38 MAPK and p-P38 MAPK as well as p-AKT, p-GSK3β, p-S6 kinase, p-MEK1 and p-ERK1/2 were quantitatively assessed using multiplex bead immunoassay in frozen specimens from 45 invasive ductal breast cancers. Twenty-nine specimens were ER^+, 15 were $HER2^+$ and 10 were triple-negative breast cancers (TNBCs). P38 MAPK was found to be expressed in all tumor specimens and was significantly (P=0.002) overexpressed in ER^+ tumors. P38 MAPK expression was lower in TNBCs than in all of the other tumors. The median expression of p-P38 MAPK was also higher in ER^+ tumors while lower in the TNBCs. HER2 status had no effect on P38 MAPK and p-P38 MAPK expression. No variation in the phosphorylation rate of P38 MAPK was observed in relation with ER, HER2 or TNBC status. Significantly higher (P=0.0048) expression of p-AKT was observed in $HER2^+$ tumors. No significant difference in p-MEK1, p-GSK3β and p-S6K expression was found in any other comparisons based on ER and HER2 expression subtypes. Investigation of the expression of multiple phosphorylated signaling proteins can be used for personalized targeted therapy. In invasive breast cancer, the overexpression of P38 MAPK may serve as a biomarker for the evaluation of P38 MAPK inhibitors.

Correspondence to: Professor Jean-Louis Merlin, Institut de Cancérologie de Lorraine, 6 Avenue de Bourgogne, CS30519, 54519 Vandoeuvre les Nancy, France
E-mail: jl.merlin@nancy.unicancer.fr

Key words: breast cancer, signaling, MAPK, estrogen receptor, HER2

Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women with more than one million new cases. Breast cancer is one of the leading causes of cancer-related mortality in women (1). Apart from surgery, adjuvant radiation therapy and chemotherapy, treatment of breast cancer is based on the identification of molecular targets, mainly estrogen receptor (ER) expression, HER2 overexpression and amplification. In ER-expressing tumors, endocrine therapy consisting of mainly tamoxifen and anti-aromatase drugs is prescribed. In human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive ($HER2^+$) tumors, anti-HER2-targeted therapies such as the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab and the tyrosine kinase inhibitor lapatinib have been proposed. Moreover, in $HER2^+$ tumors also expressing ER, the combination of both endocrine and anti-HER2 therapies have been proven to improve the outcome of patients through the blockade of signaling crosstalk leading to resistance to ER-targeted therapy. In triple-negative breast cancers (TNBCs) i.e. ER^-, PR^- and $HER2^-$ tumors, no targeted therapy has been proven effective to date, and the molecular characteristics of TNBCs have been extensively studied in order to identify putative molecular targets for drug development. Since several different growth factor pathways can stimulate breast cell growth, targeting a unique pathway may have limited effect on the inhibition of breast cancer proliferation, and the inhibition of signal transduction at a deeper point in the cascade has been envisaged.

In this context, mammalian target of rapamycin (mTOR) has been identified as the point of convergence of many mitogenic signals, which has led to the recent registration of the mTOR inhibitor everolimus in association with anti-

aromatase therapy for ER+ breast cancers (2). Another point of convergence of intracellular downstream growth factor receptor signaling is the P38 mitogen-activated protein kinase family (P38 MAPK). P38 MAPK is a member of the MAPK family which includes the extracellular signal-regulated kinase (ERK), the c-Jun N-terminal kinase (JNK), and P38 MAPK (3). P38 MAPK is comprised of four isoforms (α, β, γ and δ) that can be activated by various growth factors, inflammatory cytokines, and chemical or physical stress. The α isoform is the most abundant and is subject to a larger inter-individual variability than the other three isoforms (12). P38 MAPK plays a complex role in the regulation of cell growth, differentiation, apoptosis, and responses to inflammation or stress (4,5). P38 MAPK activity was found to be upregulated in breast, head and neck carcinomas, lymphomas, gliomas and squamous cell carcinomas (6).

In breast cancer, a high level of expression of P38 MAPK has been found to correlate with poor prognosis and to be involved in invasiveness and metastasis in relation with the urokinase plasminogen activator system (7). Activation of P38 MAPK has been observed in Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grade 2 or 3 ductal tumors (8). Expression of phosphorylated-P38 MAPK (p-P38MAPK) has been reported in ~20% of primary breast carcinomas (9). P38 MAPK overexpression has been correlated with HER2 amplification and tamoxifen resistance (10) and has been proposed as a potential prognostic marker in breast cancer (11). Specifically, phosphorylation of P38 MAPK was found to be a negative prognostic indicator in HER2-negative, lymph node-positive breast cancers (9).

The role of P38 MAPK in the regulation of breast cancer cell proliferation remains to be elucidated and has been suggested to have dual activities that include regulation of survival and proliferation depending on the expression of mutant TP53 (12) as observed in most ER- breast tumors therefore justifying the development of P38 MAPK inhibitors for the treatment of TP53-mutated, ER- breast cancers or TNBCs. Furthermore, the activation of P38 MAPK has recently been reported to regulate signaling by EGFR/c-Src crosstalk in breast cancer (13).

In addition, P38 MAPK has been recently reported to play a role in the resistance of ER+ breast tumors to endocrine therapy (14). Although the cellular mechanisms underlying the development of tamoxifen resistance in breast cancer cells are not totally understood, recent research has found that alteration of the signaling pathways (15-17) can decrease the cell sensitivity to tamoxifen. More precisely, the development of crosstalk between ER and growth factor-mediated activation of the MAPK cascade, through the activation of HER2 has been reported to increase both genomic and non-genomic ER actions in breast cancer leading to tamoxifen resistance. This justifies the combination of endocrine therapy together with aromatase inhibitors and anti-HER2 therapies with trastuzumab-based or lapatinib-based therapies for breast cancer (18). Recent studies have noted a positive correlation between activated P38 MAPK levels and tamoxifen resistance (19). P38 MAPK has been reported to potentiate ER agonist activity through increased phosphorylation of ER and enhanced ER signaling through coactivator regulation (20). P38 MAPK has been shown to play a role in breast cancer progression and invasion (21) in association with other signaling proteins such as integrins and urokinase plasminogen activator (22) as well as H-RAS (23).

P38 MAPK isoform γ has been recently shown to be selectively activated by exposure to tamoxifen, consequently recruiting nonclassical ER signaling and increased estrogen cell sensitivity (24). Therefore, increased P38 MAPK activation could define a more malignant, resistant and metastatic breast cancer phenotype and justify the evaluation of P38 MAPK inhibitors in the treatment of invasive and tamoxifen-resistant breast carcinomas (14). A number of P38 MAPK inhibitors are currently being investigated in clinical trials (25).

In the present study, we investigated the expression of P38 MAPK and p-P38 MAPK in clinical specimens of invasive breast carcinomas. We first investigated the correlation of their expression with ER and HER2 expression, and subsequently evaluated the correlation with expression levels of MAPK and PI3K signaling phosphorylated proteins such as p-AKT, p-GSK3β, p-S6 kinase, p-MEK1 and p-ERK1/2 quantitatively determined using multiplex bead immunoassay as previously described and validated in breast cancer (26).

Materials and methods

Patients and tumor characteristics. Frozen tumor samples of breast cancer from 45 patients with infiltrative ductal carcinoma were obtained from the tumor bank of our Institute (agreement with French National Cancer Institute and Ministry of Health). All patients were informed of the tumor banking procedure and no opposition was expressed. The median age at diagnosis was 56.3 years (range, 28-91).

Breast cancer tissues macroscopically selected by the pathologists were obtained immediately after surgery and were shock frozen in liquid nitrogen then cryopreserved at -80˚C. The mean tumor (SD) specimen weight was 15.2 (4.2) mg. None of the patients received any preoperative adjuvant endocrine therapy or chemotherapy. Thirty-four tumors were SBR grade 3 (Scarff-Bloom-Richardson) and 11 tumors were grade 2.

Immunohistochemistry (BenchMark Ventana) was used to detect estrogen and progesterone receptor expression and HER-2 overexpression as part of the routine clinical diagnostics using polyclonal antibody A485 (Dako, Trappes, France) immunostaining of HER2 and monoclonal antibodies 6F11 and Pgr312 (both from Novocastra, Leica Microsystèmes, Nanterre, France) for determination of estrogen and progesterone expression, respectively.

Protein extraction. The tumor specimens were first disrupted using steel bead TissueLyser (Qiagen, Courtaboeuf, France) for 15 min, and then exposed to the lysis solution (Cell Lysis kit, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) containing PMSF anti-protease for 10 sec. After centrifugation (4,500 x g for 20 min at 4˚C), the protein-containing supernatants were collected and stored frozen at -80˚C until analysis. Before being analyzed, the protein concentration was determined in each extract using 690 nm colorimetric DC protein assay kit (Bio-Rad) based on Lowry technique and adjusted to 250 μg/ml.

Multiplex bead immunoassay. The expression of the signaling phosphoproteins was analyzed using multiplex bead immunoassay as described and validated previously (26). Briefly, protein extracts were transferred into 96-well dishes and diluted with 25 µl buffered solution. Fluorescence capturing beads coupled to antibodies directed against P38 MAPK, p-P38 MAPK, p-AKT, p-GSK3β, p-P70S6K, p-MEK1, p-ERK1/2 phosphoproteins were mixed. The beads were added into each well and incubated overnight at 37˚C. Biotinylated antibodies and then streptavidin-phycoerythrin solution were then added. The positive control consisting of standard protein extract from cell lines was added to each series. The multi-well plates were then analyzed according to the manufacturer's instructions (Bio-Plex; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Frozen protein extracts from an EGFR-overexpressing human breast cancer cell line exposed to EGF were used as positive controls as reported previously (26). The results were recorded as mean fluorescence intensities expressed as arbitrary units and considered as significant when exceeding a signal/noise ratio of 3.

Statistics. All analyses were performed as triplicate and are presented as mean fluorescence intensities (SD). All statistical analyses were performed using the Wilcoxon test using R software (v.2.15.1.; the R Foundation for Statistical Computing) and the level of significance was set at $P<0.05$.

Results

Immunohistochemistry. The breat cancer tumor characteristics are summarized in Table I. The ER status as determined by immunohistochemistry was positive in 29 patients (64%) and negative in 16 patients (36%). Progesterone receptor (PR) status was positive in 18 patients (40%) and negative in 27 patients (60%). Fifteen tumors (33%) were $HER2^+$ and 30 tumors (67%) were $HER2^-$. Ten (22%) tumors were triple-negative breast cancers (TNBCs), i.e. ER^-, PR^- and $HER2^-$.

P38 MAPK and phosphorylated-P38 MAPK expression. P38 MAPK and p-P38 MAPK were found to be expressed in nearly all tumor specimens (44/45, 98%) and were significantly ($P=0.0016$) overexpressed in ER^+ tumors (Fig. 1A). The median expression of p-P38 MAPK was also higher in ER^+ when compared with that in ER^- tumors. HER2 status had no influence on P38 MAPK and p-P38 MAPK expression (Fig. 1B). P38 MAPK expression was lower in TNBCs (Fig. 1C) when compared with the expression level in all other tumor types as was p-P38MAPK expression but without reaching statistical significance. No significant variation in the phosphorylation rate of P38 MAPK, as calculated from the phosphorylated/unphosphorylated P38 MAPK expression ratios, was observed in association with ER, HER2 and TNBC status, or SBR grade.

Phosphorylated-AKT and phosphorylated-ERK1/2 expression. Significant expression of p-AKT and p-ERK1/2 was detected in 33/45 (73%) and 17/45 (38%) of the tumor extracts, respectively. p-AKT expression was found to be significantly higher ($P=0.0048$) in $HER2^+$ tumors (Fig. 2) than in $HER2^-$ tumors. No other significant difference was observed regarding either ER and TNBC status or SBR grade. No difference in p-ERK1/2 expression was observed regarding ER, HER2 and TNBC status. Expression of p-ERK1/2 was found to be significantly higher ($P=0.0235$) in SBR grade 3 than in SBR grade 2 tumors (Fig. 3).

Table I. Patient demographics and tumor characteristics.

Characteristics	Patients, n (%)
No. of patients	45 (100.0)
Age (years)	
≤50	13 (28.9)
51-69	24 (53.3)
≥70	8 (17.8)
Tumor size (mm)	
T1 (10-20)	16 (35.6)
T2 (21-50)	26 (57.8)
T3 (>51)	3 (6.7)
SBR grade	
SBR 2	11 (24.4)
SBR 3	34 (75.6)
Hormone receptor status	
ER^+	29 (64.4)
ER^-	16 (35.6)
PR^+	18 (40.0)
PR^-	27 (60.0)
HER2 status	
Positive	15 (33.3)
Negative	30 (66.7)
Triple-negative	10 (22.2)

ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor; SBR, Scarff-Bloom-Richardson; HER2, human epidermal growth factor receptor 2.

Expression of other phosphorylated-signaling proteins MEK1, GSK3β, S6K. Significant expression of p-MEK1, p-GSK3β and p-S6K was detected in 39/45 (87%), 31/45 (69%) and 37/45 (82%) of the protein extracts, respectively. No significant difference in p-MEK1, p-GSK3β and p-S6K expression was evidenced regarding either ER and TNBC status or SBR grade (data not shown). No significant correlation was found between the expression levels of any of the phosphorylated proteins.

Discussion

In breast cancer, P38 MAPK expression has previously been correlated with invasiveness and poor prognosis (8-11).

In the present study, we compared the expression of P38 MAPK and p-P38 MAPK in clinical specimens of invasive breast carcinomas in association with ER, HER2 and SBR grade and aimed to ascertain a correlation between P38 MAPK expression or activation of MEK/ERK and the AKT/mTOR signaling pathways.

In our series, expression of P38 MAPK and p-P38 MAPK was observed in nearly all tumor specimens. This was consis-

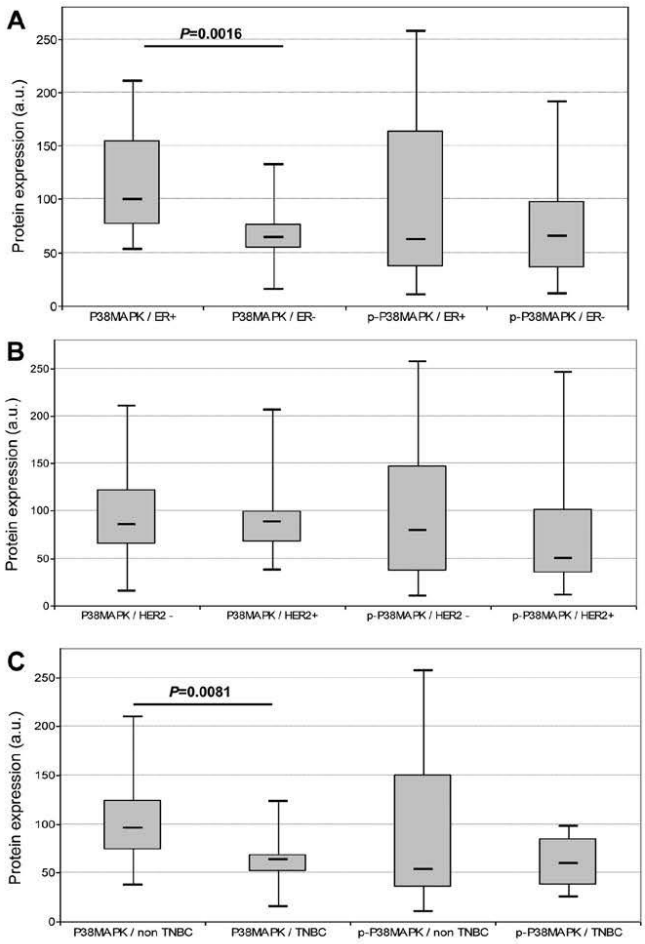


Figure 1. Expression of P38 MAPK and its phosphorylated form (p-P38 MAPK) in clinical specimens of invasive breast cancers. The results are presented as box-and-whisker plots, illustrating the median (central bar), 1st and 3rd quartiles (bottom and top of the grey box), minimum and maximum values (lower and upper bars). Expression in (A) estrogen-positive (ER$^+$) and ER-negative (ER$^-$) tumors; (B) HER2-positive (HER2$^+$) and HER2-negative (HER2$^-$) tumors; (C) triple-negative breast cancer (TNBC) and non-TNBC.

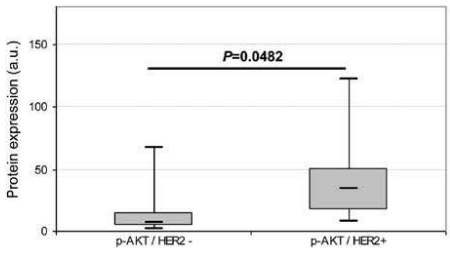


Figure 2. Expression of phosphorylated-AKT (p-AKT) in HER2-positive (HER2$^+$) and HER2-negative (HER2$^-$) tumors. The results are presented as box-and-whisker plots, illustrating the median (central bar), 1st and 3rd quartiles (bottom and top of the grey box), minimum and maximum values (lower and upper bars).

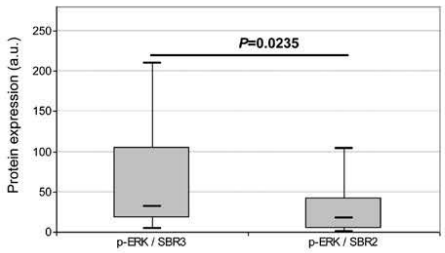


Figure 3. Expression of phosphorylated-ERK1/2 (p-ERK) in SBR grade 2 (SBR2) and grade 3 (SBR3) tumors. The results are presented as box-and-whisker plots, illustrating the median (central bar), 1st and 3rd quartiles (bottom and top of the grey box), minimum and maximum values (lower and upper bars).

tent with previously published data (11) reporting P38 MAPK and p-P38 MAPK expression in 100 and 89% of specimens, respectively, using western blot analysis, and 70% when IHC was used.

We report here that P38 MAPK was expressed at a higher level in ER^+ when compared with ER^- tumors without post-transductional activation since no variation in the phosphorylation rate of P38 MAPK was evidenced. This is consistent with previously published data (10,27) revealing the great interest in P38 MAPK in ER^+ tumors. P38 MAPK has been reported to be activated by anti-estrogens apart from ER their main target, resulting in a switch in ER signaling from its classical pathway, involving the estrogen response element (ERE) DNA domain, to the AP1-dependent non-classical pathways; therefore, activation of P38 MAPK can ultimately decrease the cellular response to endocrine therapy. Based on this concept, P38 MAPK has been proposed as a biomarker for resistance to endocrine therapy, and quantitative assessment of P38 MAPK expression and the detection of its activation in breast tumors may represent a new approach to predict the resistance of breast cancer to endocrine therapy. Furthermore, inhibition of P38 MAPK in ER^- tumors could restore ER expression and therefore restablish the sensivity to endocrine therapy (28).

Moreover, evaluation of the molecular pathway may even be proposed for specimens obtained at recurrence since the molecular pathways driving tumor growth could be altered along with tumor progression (10).

An incomplete understanding of the complex mechanisms exists concerning the relationship between MAPK activation and expression of hormone receptors and HER2 in breast carcinoma *in vitro*. In effusion specimens, p38 activation was reported to be inversely associated with the intensity of HER2 membrane expression (11).

In this context, although we did not observe any inverse relationship between HER2 and p-P38 MAPK expression, our results revealed that expression of P38 MAPK was significantly lower in TNBCs than in the other tumor subtypes. This may be reconsidered if a more specific approach of selective inhibition of P38 MAPK isoforms can be envisaged, as recent preclinical studies have demonstrated the important role played by the P38 MAPK γ isoform in TNBCs in relation with its marked induction of cell cycle arrest in the G(2)/M phase (29) and its effect on the cellular sensitivity to topoisomerase II inhibitors (30). Stimulation of topo IIα gene expression by P38 MAPKγ may contribute to increased topo IIα levels and enhanced antitumor activity of topo II inhibitors (24), therefore opening the field for the investigation of selective inhibitors of the P38 MAPK γ isoform in combination with chemotherapy.

p-ERK was detected in 73% of the tumor specimens, consistent with data reporting significant p-ERK expression in 69 to 96% of breast tumors (11,31,32). A low expression rate (35%) was only reported in one cohort (33). In our study, the expression of p-ERK was higher in high grade tumors (SBR3) consistent with data linking the activation of ERK with breast cancer cell proliferation (33).

p-AKT was detected in 38% of the tumor specimens and at a higher level in $HER2^+$ tumors, consistent with data previously published using IHC which reported p-AKT cytoplasmic and nuclear expression rates of 36 and 29%, respectively, in invasive ductal breast tumors and higher activation of AKT in $HER2^+$ tumors (34). In this study (34), a correlation was observed between nuclear p-AKT and nuclear ER and PR expression while no difference was observed for cytoplasmic p-AKT expression and cytoplasmic ER and PR expression. This is consistent with our data showing an absence of a correlation between either ER or PR and p-AKT expression since when using total protein extract analysis no difference can be determined between cytoplasmic and nuclear compartments.

As a whole, we did not find any correlation between p-AKT, p-ERK expression and P38MAPK or p-P38MAPK expression either in the total population of this study or in ER, HER2 or TNBC subgroups. Similar findings have been reported and no significant correlations were evidenced between ER and levels of p-P38MAPK, p-AKT, or p-ERK (10,11). Only several correlations have been reported between p-P38 MAPK and p-AKT and between p-P38 MAPK and p-ERK in a global population of tumor specimens from untreated patients analyzed using IHC (10). Similar to other research (11), we did not find any relationship between HER2 and p-ERK.

Collectively, our data indicate that the regulation of P38 MAPK was not directly linked to any of the investigated signaling pathways and could be considered as an independent biomarker in breast cancer. This also confirms the complexity of breast cancer oncogenesis, involving the recruitment of multiple signaling pathways.

In conclusion, P38 MAPK expression and activation are frequently observed in breast carcinoma and appear to be positively associated with the expression of the ER. Our results confirm the capability of breast cancer cells to activate P38 MAPK-mediated stress mechanisms and that P38 MAPK may represent a biological target for ER^+ breast cancer. The frequent concomitant activation of P38 MAPK, ERK and AKT indicates that breast tumor growth involves the activation of multiple signaling pathways, probably explaining the multiple mechanisms by which tumor cells develop resistance. Control of tumor growth should therefore entail the inhibition of all signaling pathways by combining multiple targeted therapies either in concomitant or in sequential use.

Acknowledgements

The present study was supported by the French 'Ligue contre le Cancer, Comité Inter-régional Grand Est' and Alexis Vautrin private research funds.

References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E and Forman D: Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 61: 69-90, 2011.
2. Baselga J, Campone M, Piccart M, *et al*: Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. N Engl J Med 366: 520-529, 2012.
3. Maemura M, Iino Y, Koibuchi Y, Yokoe T and Morishita Y: Mitogen-activated protein kinase cascade in breast cancer. Oncology 57 (Suppl 2): 37-44, 1999.
4. Ono K and Han J: The p38 signal transduction pathway: activation and function. Cell Signal 12: 1-13, 2000.
5. Frigo DE, Basu A, Nierth-Simpson EN, *et al*: p38 mitogen-activated protein kinase stimulates estrogen-mediated transcription and proliferation through the phosphorylation and potentiation of the p160 coactivator glucocorticoid receptor-interacting protein 1. Mol Endocrinol 20: 971-983, 2006.

6. Wagner EF and Nebreda A: Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. Nat Rev Cancer 9: 537-549, 2009.
7. Tang L and Han X: The urokinase plasminogen activator system in breast cancer invasion and metastasis. Biomed Pharmacother 67: 179-182, 2013.
8. Salh B, Marotta A, Wagey R, Sayed M and Pelech S: Dysregulation of phosphatidylinositol 3-kinase and downstream effectors in human breast cancer. Int J Cancer 98: 148-154, 2002.
9. Esteva FJ, Sahin AA, Smith TL, *et al*: Prognostic significance of phosphorylated P38 mitogen-activated protein kinase and HER-2 expression in lymph node-positive breast carcinoma. Cancer 100: 499-506, 2004.
10. Gutierrez MC, Detre S, Johnston S, *et al*: Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. J Clin Oncol 23: 2469-2476, 2005.
11. Davidson B, Konstantinovsky S, Kleinberg L, *et al*: The mitogen-activated protein kinases (MAPK) p38 and JNK are markers of tumor progression in breast carcinoma. Gynecol Oncol 102: 453-461, 2006.
12. Chen L, Mayer JA, Krisko TI, *et al*: Inhibition of the p38 kinase suppresses the proliferation of human ER-negative breast cancer cells. Cancer Res 69: 8853-8861, 2009.
13. Mueller KL, Powell K, Madden JM, Eblen ST and Boerner JL: EGFR tyrosine 845 phosphorylation-dependent proliferation and transformation of breast cancer cells require activation of p38 MAPK. Transl Oncol 5: 327-334, 2012.
14. Antoon JW, Bratton MR, Guillot LM, *et al*: Pharmacology and anti-tumor activity of RWJ67657, a novel inhibitor of p38 mitogen activated protein kinase. Am J Cancer Res 2: 446-458, 2012.
15. Ghayad SE, Vendrell JA, Ben Larbi S, Dumontet C, Bieche I and Cohen PA: Endocrine resistance associated with activated ErbB system in breast cancer cells is reversed by inhibiting MAPK or PI3K/Akt signaling pathways. Int J Cancer 126: 545-562, 2010.
16. Normanno N, Di Maio M, De Maio E, *et al*: Mechanisms of endocrine resistance and novel therapeutic strategies in breast cancer. Endocr Relat Cancer 12: 721-747, 2005.
17. Musgrove EA and Sutherland RL: Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. Nat Rev Cancer 9: 631-643, 2009.
18. Cortés J, Saura C, Bellet M, *et al*: HER2 and hormone receptor-positive breast cancer - blocking the right target. Nat Rev Clin Oncol 8: 307-311, 2011.
19. Massarweh S, Osborne CK, Creighton CJ, *et al*: Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. Cancer Res 68: 826-833, 2008.
20. Lee H and Bai W: Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation. Mol Cell Biol 22: 5835-5845, 2002.
21. Reddy KB, Nabha SM and Atanaskova N: Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. Cancer Metastasis Rev 22: 395-403, 2003.
22. Chen J, Baskerville C, Han Q, Pan ZK and Huang S: α(v) integrin, p38 mitogen-activated protein kinase, and urokinase plasminogen activator are functionally linked in invasive breast cancer cells. J Biol Chem 276: 47901-47905, 2001.
23. Kim MS, Lee EJ, Kim HR and Moon A: p38 kinase is a key signaling molecule for H-Ras-induced cell motility and invasive phenotype in human breast epithelial cells. Cancer Res 63: 5454-5461, 2003.
24. Qi X, Zhi H, Lepp A, *et al*: p38γ mitogen-activated protein kinase (MAPK) confers breast cancer hormone sensitivity by switching estrogen receptor (ER) signaling from classical to nonclassical pathway via stimulating ER phosphorylation and c-Jun transcription. J Biol Chem 287: 14681-14691, 2012.
25. Banerjee A, Koziol-White C and Panettieri R Jr: p38 MAPK inhibitors, IKK2 inhibitors, and TNFα inhibitors in COPD. Curr Opin Pharmacol 12: 287-292, 2012.
26. Chergui F, Chrétien AS, Bouali S, *et al*: Validation of a phospho-protein array assay for characterization of human tyrosine kinase receptor downstream signaling in breast cancer. Clin Chem 55: 1327-1336, 2009.
27. Svensson S, Jirström K, Rydén L, *et al*: ERK phosphorylation is linked to VEGFR2 expression and Ets-2 phosphorylation in breast cancer and is associated with tamoxifen treatment resistance and small tumours with good prognosis. Oncogene 24: 4370-4379, 2005.
28. Bhatt S, Xiao Z, Meng Z and Katzenellenbogen BS: Phosphorylation by p38 mitogen-activated protein kinase promotes estrogen receptor α turnover and functional activity via the SCF(Skp2) proteasomal complex. Mol Cell Biol 32: 1928-1943, 2012.
29. Meng F, Zhang H, Liu G, *et al*: p38γ mitogen-activated protein kinase contributes to oncogenic properties maintenance and resistance to poly (ADP-ribose)-polymerase-1 inhibition in breast cancer. Neoplasia 13: 472-482, 2011.
30. Qi X, Hou S, Lepp A, *et al*: Phosphorylation and stabilization of topoisomerase IIα protein by p38γ mitogen-activated protein kinase sensitize breast cancer cells to its poison. J Biol Chem 286: 35883-35890, 2011.
31. Milde-Langosch K, Bamberger AM, Rieck G, *et al*: Expression and prognostic relevance of activated extracellular-regulated kinases (ERK1/2) in breast cancer. Br J Cancer 92: 2206-2215, 2005.
32. Linderholm BK, Hellborg H, Johansson U, Skoog L and Lehtiö J: Vascular endothelial growth factor receptor 2 and downstream p38 mitogen-activated protein kinase are possible candidate markers of intrinsic resistance to adjuvant endocrine treatment in steroid receptor-positive breast cancer. Breast Cancer Res Treat 125: 457-465, 2011.
33. Hermanto U, Zong CS and Wang LH: Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase selectively inhibits cell proliferation in human breast cancer cells displaying enhanced insulin-like growth factor I-mediated mitogen-activated protein kinase activation. Cell Growth Differ 11: 655-664, 2000.
34. Park SS and Kim SW: Activated Akt signaling pathway in invasive ductal carcinoma of the breast: Correlation with HER2 overexpression. Oncol Rep 18: 139-143, 2007.

Annexe 2 : ADN tumoral circulant, Chapitre 11, « Les biomarqueurs en Oncologie », Pr. JL Merlin, Springer, Paris, 2014.

ADN tumoral circulant 11

M. Lion, A. Harlé, J.-L. Merlin

En oncologie, la recherche de mutations somatiques à visée théranostique est devenue la règle pour la prescription de certaines thérapies ciblées. Dans le cas du cancer colorectal, la recherche des mutations des gènes *RAS* est devenue essentielle pour la décision thérapeutique, le statut RAS sauvage étant nécessaire pour assurer l'efficacité des anti-EGFR (cetuximab et panitumumab) [1, 2]. De même, le gefitinib ne peut être prescrit qu'aux patients présentant une mutation activatrice de l'EGFR dans les cancers bronchiques non à petites cellules [3]. La mise en évidence de nouveaux biomarqueurs joue un rôle important dans l'évaluation de la réponse aux traitements expliquant la place de plus en plus importante qu'occupe la biologie moléculaire en oncologie. La caractérisation moléculaire des tumeurs permet de prédire l'efficacité des thérapies ciblées. D'où la nécessité de développer des techniques de détection de plus en plus sensibles, rapides et performantes, l'objectif actuel étant de fournir une thérapeutique la plus personnalisée possible, adaptée à chaque type de tumeur et à chaque patient.

Actuellement, toute recherche de mutation somatique nécessite au préalable la réalisation d'une biopsie ou d'une exérèse chirurgicale d'une métastase ou de la tumeur primitive. Le matériel prélevé est ensuite fixé, conformément aux recommandations de l'INCa [4] dans du formol tamponné ou plus rarement dans d'autres fixateurs comme l'AFA (acide acétique, formol et alcool) puis inclus en paraffine. Outres les problèmes liés au pré-analytique (temps d'ischémie chaude et froide, fixation des tissus…) [5], la réalisation de biopsie présente parfois certains inconvénients, notamment les contraintes liées à l'accessibilité du site à biopsier mais surtout relatives à l'invasivité et à la douleur que peut provoquer ce geste médical. De plus, il est considéré comme non éthique et, pour le moment, non scientifiquement fondé de pratiquer une seconde biopsie chez un patient pour lequel un premier résultat contributif

M. Lion, A. Harlé, J.-L. Merlin (✉) Institut de cancérologie de Lorraine, service de biopathologie, 6, avenue de Bourgogne, 54519 Vandœuvre-lès-Nancy – E-mail : m.lion@nancy.unicancer.fr

Sous la direction de Jean-Louis Merlin, *Les biomarqueurs moléculaires en oncologie*
ISBN : 978-2-8178-0444-6, © Springer-Verlag Paris, 2014

aurait été obtenu. Ces différents points justifient l'intérêt de développer des techniques innovantes pouvant apporter les mêmes informations que les techniques de biopsies conventionnelles, moins invasives, moins douloureuses et moins contraignantes pour le patient.

Lors de la croissance tumorale, certaines cellules tumorales meurent et relarguent leurs contenu dans la circulation sanguine [6, 7]. Il a été mis en évidence que le plasma contenait une représentation de l'ensemble du génome de la tumeur et donc les mêmes altérations géniques et épigéniques que la tumeur dont il provient [8, 9].

Le concept de « biopsie liquide » a ainsi été développé. Ce concept consiste à isoler de l'ADN relargué par la tumeur dans les systèmes fluides (sang, sécrétions, urine…) et de détecter les mutations somatiques [9, 10]. Le développement de cette technique assurerait ainsi un meilleur confort au patient et serait donc plus facile à mettre en œuvre. L'ADN tumoral circulant pourrait devenir un biomarqueur de choix dans le diagnostic, le suivi mais également dans la théranostique des cancers.

Dans ce contexte, un certain nombre de techniques permettant la détection d'ADN en très faible quantité dans le sang ont été développées. Ces techniques doivent être simples à mettre en œuvre, reproductibles, peu coûteuses mais surtout très sensibles et spécifiques. La principale difficulté rencontrée avec cette méthode est la quantité faible d'ADN tumoral circulant pouvant être isolée et détectée dans le sang [10, 11]. Elle représente une quantité infime de l'ADN total circulant [11, 12], ce qui nécessite des techniques très spécifiques de détection.

Plusieurs études ont montré que la mesure quantitative de l'ADN tumoral permettait un monitoring de la maladie métastatique [8, 10, 13, 14]. Par exemple, dans les cancers du sein, il apparaît que la corrélation entre les variations du volume tumoral et le taux d'ADN tumoral circulant est meilleure qu'avec d'autres marqueurs tels que les cellules tumorales circulantes ou le marqueur sanguin CA15-3. La spécificité serait donc supérieure pour le diagnostic et le suivi de la maladie, notamment en termes de progression tumorale ou métastatique dans les cancers du sein [10, 13]. L'augmentation du nombre de copies d'ADN tumoral circulant serait donc un marqueur plus précoce que les éléments obtenus en radiologie standard, capable de prédire des rechutes cinq mois plus tôt [10, 13]. L'augmentation du nombre de copies d'ADN tumoral circulant apparaît donc comme un facteur de mauvais pronostic et possèderait un impact sur la survie globale. L'évaluation régulière du nombre de copies permettrait donc un monitoring de l'efficacité des thérapies anticancéreuses, qu'elles soient standards ou ciblées. L'essor du séquençage haut débit a permis de développer nos connaissances, de confirmer la complexité de l'hétérogénéité intratumorale et de montrer qu'il existe de manière très vraisemblable des différences entre les tumeurs primitives et les métastases à distance mais également entre les différents sites métastatiques [14, 15]. Il a été mis en évidence que différents sous-clones

tumoraux issus de la même tumeur pouvaient acquérir des mutations différentes [16]. La détection de mutations à partir d'ADN tumoral circulant permet donc de pallier les problèmes d'hétérogénéité tumorale par détection des mutations rares dans les sous-clones mineurs, ou dans des sous-clones de différents sites métastatiques, qui pourraient ne pas être identifiés par séquençage à partir d'une biopsie conventionnelle réalisée à partir d'un site tumoral unique [16]. Il n'est en revanche pas possible pour le moment de savoir à quel site appartiennent les mutations détectées sur de l'ADN tumoral circulant (tumeur primitive, métastase…). De plus, il apparaît que certains sites tumoraux relarguent plus de cellules que d'autres. Les tissus osseux par exemple relarguent plus de cellules comparativement au tissu cérébral, ce qui peut également ajouter des difficultés au diagnostic et à la détection de mutations dans certaines tumeurs [16].

Les études réalisées sur ADN tumoral circulant ont été effectuées à différents stades de la maladie afin d'établir une corrélation entre les mutations identifiées, la taille de la tumeur et le stade de la maladie [8, 9].

Des études ont mis en évidence la concordance des mutations détectées par prise de sang et à partir de la biopsie de la tumeur primitive [8, 9]. La mise en évidence de la concordance entre mutations trouvées par prélèvement sanguin et biopsie solide nécessite de réaliser les prélèvements en même temps en raison de l'évolution des caractéristiques moléculaires de la tumeur au cours de la maladie [9]. La prise de sang doit être de plus réalisée avant la biopsie pour éviter les phénomènes de relargage qui pourraient biaiser les résultats obtenus.

La « biopsie liquide » apparaît donc comme le nouveau paradigme pour la caractérisation et le diagnostic moléculaire de la tumeur au cours du traitement et la mise en évidence de résistances. Une pression de sélection associée à certains traitements et conférant une résistance a en effet été démontrée [16]. La détection et la recherche de mutation sur ADN tumoral circulant seraient donc essentielles dans l'évaluation de la réponse au traitement mais également permettraient l'adaptation des traitements en fonction de l'apparition des résistances [17]. Il a notamment été mis en évidence une augmentation des mutations du gène *PIK3CA* après traitement par paclitaxel, des mutations *MED1* induit par tamoxifène et trastuzumab puis par lapatinib dans le cancer du sein, ou encore des mutations *RB1* après traitement par cisplatine dans les cancers de l'ovaire, ainsi que des mutations de *EGFR* après traitement par géfitinib. Le suivi moléculaire par biopsie liquide permettrait donc de suivre l'évolution des variations génomiques du cancer en réponse aux thérapies [10, 17].

La mise en place de ce type d'analyse en routine serait donc une avancée majeure dans le domaine du diagnostic moléculaire en oncologie. Cependant, cela nécessite au préalable une standardisation des techniques afin d'assurer des résultats de qualité et comparables entre laboratoires (procédures sur les conditions de collecte de sang, le traitement du plasma ou du sérum, le stockage, la conservation, les conditions cliniques, les variations diurnes, etc.) [18].

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses techniques de diagnostic moléculaire ultrasensibles destinées à l'analyse de l'ADN tumoral circulant ont fait leur apparition sur le marché, parmi lesquelles nous pouvons citer la digital PCR, la droplet digital PCR (BioRad®, Marnes-la-Coquette, France), le beaming (Sysmex®, Kobe, Japan), la raindrop digital PCR (RainDance®, Billerica, États-Unis) et la méthode Intplex (INSERM, Montpellier, France). Toutes ces technologies permettent la détection et l'énumération de variations génétiques à partir d'ADN tumoral circulant (Tableau I).

- **Le beaming** *(beads, emulsion, amplification and magnetics)* (Sysmex®) est une technique réalisée en quatre étapes : pré-amplification, PCR en émulsion, hybridation et cytométrie de flux. Il s'agit d'une technique de PCR sur molécule d'ADN fixée sur bille magnétique sur lesquelles se trouvent les amorces spécifiques du gène d'intérêt. La PCR est réalisée sur les billes en émulsion. Des sondes fluorescentes marquées spécifiques de la séquence sauvage ou de la mutation sont ensuite ajoutées et s'hybrident à l'ADN amplifié. La dernière étape de la technique consiste en la détection de la fluorescence par cytométrie de flux et donc en la quantification du nombre de billes contenant de l'ADN muté. Le seuil de détection d'ADN circulant est de 0,01 % [7, 11, 16, 19-21].
- **La digital PCR** est une approche offrant une plus grande sensibilité et spécificité en comparaison à la PCR temps réel. Elle permet la détection d'un allèle cible à partir d'une faible quantité d'un échantillon en utilisant des quantités de réactifs plus faibles que la PCR conventionnelle. Elle permet la détection d'une copie par population. Cette technique nécessite au préalable l'isolement de molécules d'ADN par répartition de l'échantillon dans de multiples puits selon la méthode de dilution ultime. Une fois chaque molécule d'ADN isolée, une PCR est réalisée dans chaque puits. Chaque puits contient *in fine* une seule molécule d'ADN, c'est-à-dire que chaque puits contient zéro ou une copie de la séquence d'intérêt, d'où l'appellation « digitale » en comparaison à l'aspect binaire de l'approche [22-24].
  Cette technique permet l'identification des portions portant la mutation (positif) et des portions ne portant pas l'anomalie recherchée (négatif). Ainsi, à l'issue des réactions de PCR, le nombre de copies d'un allèle cible correspond au nombre de puits dans lesquels on peut détecter un signal de fluorescence.
  L'étude du rapport négatif/positif permet également de déterminer un nombre de copies d'ADN mutés, sans avoir recours à des contrôles internes [22-24].
- **La droplet digital PCR.** L'échantillon à analyser est émulsionné et réparti dans 20 000 gouttelettes contenant la cible d'intérêt et l'ADN non muté, distribués au hasard dans les gouttelettes. Ces gouttelettes sont ensuite transférées sur une plaque de 96 puits et l'amplification a lieu à l'aide d'un thermocycleur classique. Après amplification, chaque gouttelette

produit un signal fluorescent positif ou négatif indiquant si la mutation cible est présente ou non. Le nombre de gouttelettes positives et négatives dans chaque puits est utilisé pour calculer la concentration de la séquence d'intérêt. Les gouttelettes positives et négatives sont comptées dans l'échantillon puis un logiciel calcule la concentration d'ADN en copies par mL [25-27].

- **La raindrop digital PCR** (Raindance) est une technique de PCR digitale qui permet la détection d'allèles tumoraux peu fréquents. Il s'agit d'une technique sensible, spécifique qui permet une détection quantitative des mutations. Elle utilise des marqueurs de couleurs et d'intensités différentes permettant la détection de mutations spécifiques. Cette technique génère 1 à 10 millions de gouttelettes de taille de l'ordre du picolitre, ce qui est 500 à 10 000 fois plus performant que les autres techniques. Chaque gouttelette contient une molécule d'ADN. Cette technique mesure le ratio des gouttelettes présentant une mutation spécifique aux gouttelettes ne contenant que de l'ADN sauvage. Quatre-vingt mille réactions de PCR par seconde par gouttelette sont réalisées simultanément. Cette PCR en émulsion fait appel à des sondes Taqman® spécifiques des gènes mutés et non mutés en présence d'amorces et de l'échantillon d'ADN. Les sondes spécifiques sont conjuguées à un fluorophore qui générera un signal fluorescent [28-31].
  Cette technique se réalise en trois grandes étapes : mise en émulsion, puis recueil de l'émulsion dans un tube PDMS (polydiméthylsiloxane) scellé (dispositif de collecte et de réinjection), thermocyclage de l'émulsion pour effectuer la PCR, puis dépôt sur un dispositif microfluidique. Au cours de l'amplification, les sondes Taqman® sont clivées et le fluororophore est libéré. L'amplification de l'ADN non muté génère un signal rouge fluorescent et celle de l'ADN muté un signal vert fluorescent. L'émulsion est ensuite réinjectée sur une puce microfluidique et les gouttelettes sont espacées par une solution huileuse, le signal fluorescent de chaque gouttelette est analysé avec calcul du ratio muté/non muté. Une fluorescence jaune est générée par les gouttelettes contenant de l'ADN à la fois muté et non muté, l'absence de fluorescence quant à elle est due à l'absence d'ADN. Cette technique présente de nombreux avantages, notamment une très bonne sensibilité. Elle peut détecter 1 mutant parmi 250 000 molécules de type sauvage avec une limite inférieure de détection de 1 à plus de 1 000 000. C'est une technique en multiplexage qui permet donc de réaliser simultanément l'analyse de 10 mutations [28-31]. La réaction a lieu en tube fermé afin d'assurer la meilleure qualité en éliminant les risques de contamination [28-31].
- **La méthode Intplex** est une Q-PCR spécifique d'allèle qui permet la détection de mutation et la détermination de la concentration d'ADN circulant [6]. Elle utilise un bloqueur spécifique d'allèle qui empêche l'amplification des séquences non mutées. Elle prend en compte la taille

Tableau I - Différentes techniques de digital PCR

Fabricant	Technique	Volume de l'échantillon	Nombre d'échantillons	qPCR	Précision	Multiplexage
Bio-Rad	QX200™ Droplet Digital™ PCR System	– 20 µl	– 1-8 échantillons/cartouche – 1-96 échantillons/run – 20 000 gouttelettes par échantillon	Non	+/– 10 %	Oui – Utilisation de 2 couleurs – Détection possibles de 2 mutations
RainDance Technologies	RainDrop™ Digital PCR System	– 5-50 µl	– 8 échantillons par run (5 millions de gouttelettes par minute) – 10^7 gouttelettes par échantillon – 8×10^7 gouttelettes par run	Non	Détection : 1mutant/25 × 10^4 wildtype Limite de détection : 1/10^6	Oui – Utilisation de 2 couleurs (avec possibilité de faire varier la concentration des sondes) – Détection possible de 10 mutations
IRCM	Inrplex	– 1 ml de Plasma – 5 µl d'ADN extrait	Plaque 96 puits	Oui	< 0,01 %	Oui – Détection possible de 1 à 10 mutations
Sysmex	BEAMing	– Echantillon initial de sérum/plasma: 0,5 ml-4 ml	Plaque 96 puits (5 puits contenant chacun 100µl d'émulsion) – Diamètre billes : 1µm – Compartiment de PCR : →diamètre : 3-10 µm → volume : 15-400 fl	Non	< 0,1 %	Oui – Détection possible de 10 mutations
Life technologies	QuantStudio™ 12K Flex System	– Plaque 96 puits : 10-100 µl – Plaque 384 puits : 5-20 µl	Plaque 96 puits : 10-100 µl Plaque 384 puits : 5-20 µl	Oui	< 1 copie	Oui – Utilisation de 2 couleurs – Détection possibles de 2 mutations
Fluidigm Corporation	– Digital PCR Biomark HD 48.770 digital Array IFC – Digital PCR EP1 48.770 Digital Array IFC	– 8 µl d'échantillon minimum	48 entrées par puce	Oui	1 copie/0,85 nl de réaction	Oui – Utilisation de 5 couleurs – Détection possible de 5 mutations

des ADN circulants < 135 pb et compare l'amplification des séquences de même taille et de même région (300 pb). Il s'agit d'un design expérimental permettant une grande sensibilité (0,005 % *mutant to WT ratio*). De plus, il s'agit d'une technique peu chère et rapide, ne durant que 2 jours et qui est environ 3 fois plus rapide que le beaming (ou *Fluidigm based methods*). Cette méthode a été testée sur 29 échantillons de plasma de sujets sains et aucune mutation n'a été détectée. Sur les échantillons cliniques de patients, le plus faible taux de mutations des gènes *KRAS* détectées dans le CCRm est de 0,013 %.

Concernant les techniques, les seuils de détection des différentes méthodes utilisées pour analyser les mutations à partir d'ADN extrait de tissu hétérogène sont variables : 10-20 % pour le séquençage directe, 5 à 10 % pour les techniques de PCR et < 10^{-6} pour les techniques de PCR digitale. Ces seuils ont un impact potentiel direct sur le diagnostic moléculaire exprimé de façon qualitative [32].

L'analyse de l'ADN tumoral circulant est un examen en plein essor faisant appel à des techniques sensibles innovantes. Sa détection devrait permettre à court ou moyen terme la mise en place d'un suivi thérapeutique, mais également la mise en évidence de l'apparition de résistances aux traitements ou tout simplement la réponse à une thérapie anticancéreuse. Son rôle prédictif de la récidive de la maladie est également un point particulièrement intéressant. Les techniques actuellement disponibles sont cependant, pour la plupart, toujours à l'état de recherche et ne sont pas reconnues comme des examens diagnostiques validés. L'étude récente d'une équipe Montpelliéraine a démontré la faisabilité clinique sur 106 patients atteints d'un cancer colorectal métastatique et l'existence d'une corrélation forte entre l'ADN tumoral retrouvé au niveau circulant et le génome tumoral [33]. La faisabilité de ces techniques en routine reste cependant à démontrer.

Références

1. Douillard JY, Olinier KS, Tabernero J, *et al.* (2013) Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. N Engl J Med. 369(11):1023-34
2. Stintzing S, Jung A, Rossius L, *et al.* (2013) Analysis of KRAS/NRAS and BRAF mutations in Fire-3: A Randomized phase III study of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab as fist-line treatment for wild-type (WT) KRAS (exon 2) metastatic colorectal cancer (mCRC) patients. European Cancer Congress, LBA 17.
3. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K (2011) Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. Nat Rev Cancer 11(6): 426-37
4. Bonnes pratiques pour la recherche à visée théranostique de mutations somatiques dans les tumeurs solides. e-cancer; 2010
5. Hofman V, Ilie M, Gavric-Tanga V, *et al.* (2010) [Role of the surgical pathology laboratory in the pre-analytical approach of molecular biology techniques]. Ann Pathol 30(2): 85-93

6. Mouliere F, Thierry AR (2012) The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients. Expert Opin Biol Ther 2012(12): 18
7. Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P (2007) Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. Mutat Res 635(2-3): 105-17
8. Ramirez JL, Taron M, Balana C, *et al.* (2003) Serum DNA as a tool for cancer patient management. Rocz Akad Med Bialymst 48: 34-41
9. Madic J, Piperno-Neumann S, Servois V, *et al.* (2013) Pyrophosphorolysis-activated polymerization detects circulating tumor DNA in metastatic uveal melanoma. Clin Cancer Res 18(14): 3934-41
10. Kirk R (2013) Breast cancer: Circulating tumour DNA the better of the blood biomarkers. Nat Rev Clin Oncol 10(5): 26
11. Benesova L, Belsanova B, Suchanek S, *et al.* (2013) Mutation-based detection and monitoring of cell-free tumor DNA in peripheral blood of cancer patients. Anal Biochem 433(2): 227-34
12. Tong YK, Lo YM (2006) Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. Clin Chim Acta 363(1-2):187-96
13. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, *et al.* (2013) Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. N Engl J Med 368(13): 1199-209
14. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A (2013) Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. Nat Rev Clin Oncol 10(8): 472-84
15. De Mattos-Arruda L, Cortes J, Santarpia L, *et al.* (2013) Circulating tumour cells and cell-free DNA as tools for managing breast cancer. Nat Rev Clin Oncol 10(7): 377-89
16. Richardson AL, Iglehart JD (2012) BEAMing up personalized medicine: mutation detection in blood. Clin Cancer Res 18(12): 3209-11
17. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, *et al.* (2013) Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. Nature 497(7447): 108-12
18. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR (2013) Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. Clin Chim Acta 424: 222-30
19. Lauring J, Park BH (2011) BEAMing sheds light on drug resistance. Clin Cancer Res 17(24): 7508-10
20. Heitzer E, Auer M, Hoffmann EM, *et al.* (2013) Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA of patients with cancer. Int J Cancer 133(2): 346-56
21. Higgins MJ, Jelovac D, Barnathan E, *et al.* (2012) Detection of tumor PIK3CA status in metastatic breast cancer using peripheral blood. Clin Cancer Res 18(12): 3462-9
22. Pohl G, Shih Ie M (2004) Principle and applications of digital PCR. Expert Rev Mol Diagn 4(1): 41-7
23. Vogelstein B, Kinzler KW (1999) Digital PCR. Proc Natl Acad Sci U S A 96(16): 9236-41
24. Sanders R, Huggett JF, Bushell CA, *et al.* (2011) Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. Anal Chem 83(17): 6474-84
25. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, *et al.* (2011) High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. Anal Chem 83(22): 8604-10
26. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, *et al.* (2011) Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. Anal Chem 84(2): 1003-11
27. Shuga J, Zeng Y, Novak R, *et al.* (2013) Single molecule quantitation and sequencing of rare translocations using microfluidic nested digital PCR. Nucleic Acids Res 41(16):e159
28. Pekin D, Skhiri Y, Baret JC, *et al.* (2011) Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. Lab Chip 11(13): 2156-66
29. Brouzes E, Medkova M, Savenelli N, *et al.* (2009) Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening. Proc Natl Acad Sci USA 106(34): 14195-200

30. Zhong Q, Bhattacharya S, Kotsopoulos S, *et al.* (2011) Multiplex digital PCR: breaking the one target per color barrier of quantitative PCR. Lab Chip 11(13): 2167-74
31. Taly V, Pekin D, Benhaim L, *et al.* (2013) Multiplex Picodroplet Digital PCR to Detect KRAS Mutations in Circulating DNA from the Plasma of Colorectal Cancer Patients. Clin Chem 2013: 12
32. Mouliere F, El Messaoudi S, Gongora C, *et al.* (2013) Circulating Cell-Free DNA from Colorectal Cancer Patients May Reveal High KRAS or BRAF Mutation Load. Transl 6(3): 319-28
33. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, *et al.* (2014) Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. Nat Med. 20(4):430-5.

Références Bibliographiques

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

2. INCa. La Situation du Cancer en France en 2012. Paris: INCa; 2012.

3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100(1):57-70.

4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-74.

5. Newbold R. Cancer: mutant ras proteins and cell transformation. Nature. 1984;310(5979):628-9.

6. Chang EH, Furth ME, Scolnick EM, Lowy DR. Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. Nature. 1982;297(5866):479-83.

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

8. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. N Engl J Med. 2013;369(11):1023-34.

9. Stintzing S, Jung A, Rossius L, Modest DP, Fischer von Weikersthal L, Decker T, et al. Analysis of KRAS/NRAS and BRAF mutations in FIRE-3: a randomized phase III study of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab as first-line treatment for wild-type (WT) KRAS (exon 2) metastatic colorectal cancer patients. Presented at: European Cancer Congress 2013. Amsterdam, The Netherlands; 2013.

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

11. Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaloupiti D, Siannis F, Bafaloukos D, Kosmidis P, et al. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a

systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. Lancet Oncol. 2008;9(10):962-72.

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

13. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate. Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project. J Clin Oncol. 1992;10(6):896-903.

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

15. de Gramont A, Bosset JF, Milan C, Rougier P, Bouche O, Etienne PL, et al. Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study. J Clin Oncol. 1997;15(2):808-15.

16. Van Cutsem E, Twelves C, Cassidy J, Allman D, Bajetta E, Boyer M, et al. Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study. J Clin Oncol. 2001;19(21):4097-106.

17. Hoff PM, Ansari R, Batist G, Cox J, Kocha W, Kuperminc M, et al. Comparison of oral capecitabine versus intravenous fluorouracil plus leucovorin as first-line treatment in 605 patients with metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase III study. J Clin Oncol. 2001;19(8):2282-92.

18. de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. J Clin Oncol. 2000;18(16):2938-47.

19. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. Lancet. 2000;355(9209):1041-7.

20. Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. J Clin Oncol. 2004;22(2):229-37.

21. Seymour MT, Maughan TS, Ledermann JA, Topham C, James R, Gwyther SJ, et al. Different strategies of sequential and combination chemotherapy for patients with poor prognosis advanced colorectal cancer (MRC FOCUS): a randomised controlled trial. Lancet. 2007;370(9582):143-52.

22. Colucci G, Gebbia V, Paoletti G, Giuliani F, Caruso M, Gebbia N, et al. Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. J Clin Oncol. 2005;23(22):4866-75.

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

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

25. Ychou M, Viret F, Kramar A, Desseigne F, Mitry E, Guimbaud R, et al. Tritherapy with fluorouracil/leucovorin, irinotecan and oxaliplatin (FOLFIRINOX): a phase II study in colorectal cancer patients with non-resectable liver metastases. Cancer Chemother Pharmacol. 2008;62(2):195-201.

26. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus

FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. J Clin Oncol. 2010;28(31):4697-705.

27. Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. Ann Oncol. 2014(12).

28. Therkildsen C, Bergmann TK, Henrichsen-Schnack T, Ladelund S, Nilbert M. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. Acta Oncol. 2014;53(7):852-64.

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

30. Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, Fasola G, Canon JL, Hecht JR, et al. PEAK: A Randomized, Multicenter Phase II Study of Panitumumab Plus Modified Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin (mFOLFOX6) or Bevacizumab Plus mFOLFOX6 in Patients With Previously Untreated, Unresectable, Wild-Type KRAS Exon 2 Metastatic Colorectal Cancer. J Clin Oncol. 2014;32(21):2240-7.

31. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcberg JR, Tu D, Au HJ, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. N Engl J Med. 2007;357(20):2040-8.

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

33. Van Cutsem E, Kohne CH, Lang I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. J Clin Oncol. 2011;29(15):2011-9.

34. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol. 2009;27(5):663-71.

35. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, Zubel A, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. Ann Oncol. 2011;22(7):1535-46.

36. Bokemeyer C, Van Cutsem E, Rougier P, Ciardiello F, Heeger S, Schlichting M, et al. Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. Eur J Cancer. 2012;48(10):1466-75.

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

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

39. Kubicka S, Greil R, Andre T, Bennouna J, Sastre J, Van Cutsem E, et al. Bevacizumab plus chemotherapy continued beyond first progression in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with bevacizumab plus chemotherapy: ML18147 study KRAS subgroup findings. Ann Oncol. 2013;24(9):2342-9.

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

41. Chaix M, Vincent J, Lorgis V, Ghiringhelli F. FOLFIRINOX Bevacizumab Is a Promising Therapy for Chemorefractory Metastatic Colorectal Cancer. Oncology. 2014;87(3):148-58.

42. Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, Prenen H, Prausova J, Macarulla T, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. J Clin Oncol. 2012;30(28):3499-506.

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

44. Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran SE, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2014;2045(14):70330-4.

45. Venook A. CALGB/SWOG 80405: Phase III trial of irinotecan/5-FU/leucovorin (FOLFIRI) or oxaliplatin/5-FU/leucovorin (mFOLFOX6) with bevacizumab (BV) or cetuximab (CET) for patients (pts) with KRAS wild-type (wt) untreated metastatic adenocarcinoma of the colon or rectum (MCRC). In: J Clin Oncol 32:5s saL, editor. 2014 ASCO Annual Meeting; 2014; 2014.

46. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. Nature. 2001;411(6835):355-65.

47. Robert J. Signalisation cellulaire et cancer. . Paris: Springer-Verlag; 2010.

48. Sergina NV, Moasser MM. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. Trends Mol Med. 2007;13(12):527-34.

49. Hubert P. [Growth factors of the EGF family and their receptors]. Bull Cancer. 2007;94(7 Suppl):F137-45.

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

51. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2004;4(5):361-70.

52. Morgillo F, Bareschino MA, Bianco R, Tortora G, Ciardiello F. Primary and acquired resistance to anti-EGFR targeted drugs in cancer therapy. Differentiation. 2007;75(9):788-99.

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

54. Flynn JF, Wong C, Wu JM. Anti-EGFR Therapy: Mechanism and Advances in Clinical Efficacy in Breast Cancer. J Oncol. 2009;2009:526963.

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

56. Miyanaga T, Hirato J, Nakazato Y. Amplification of the epidermal growth factor receptor gene in glioblastoma: an analysis of the relationship between genotype and phenotype by CISH method. Neuropathology. 2008;28(2):116-26.

57. Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H, et al. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. Nature. 1985;313(5998):144-7.

58. Veale D, Ashcroft T, Marsh C, Gibson GJ, Harris AL. Epidermal growth factor receptors in non-small cell lung cancer. Br J Cancer. 1987;55(5):513-6.

59. Weichselbaum RR, Dunphy EJ, Beckett MA, Tybor AG, Moran WJ, Goldman ME, et al. Epidermal growth factor receptor gene amplification and expression in head and neck cancer cell lines. Head Neck. 1989;11(5):437-42.

60. Azuma M, Danenberg KD, Iqbal S, El-Khoueiry A, Zhang W, Yang D, et al. Epidermal growth factor receptor and epidermal growth factor receptor variant III gene expression in metastatic colorectal cancer. Clin Colorectal Cancer. 2006;6(3):214-8.

61. Spindler KL, Olsen DA, Nielsen JN, Brandslund I, Poulsen HS, Villingshoj M, et al. Lack of the type III epidermal growth factor receptor mutation in colorectal cancer. Anticancer Res. 2006;26(6C):4889-93.

62. Wendt MK, Balanis N, Carlin CR, Schiemann WP. STAT3 and epithelial-mesenchymal transitions in carcinomas. Jakstat. 2014;3(1):e28975.

63. Larsen AK, Ouaret D, El Ouadrani K, Petitprez A. Targeting EGFR and VEGF(R) pathway cross-talk in tumor survival and angiogenesis. Pharmacol Ther. 2011;131(1):80-90.

64. Boccaccio C, Luraghi P, Comoglio PM. MET-Mediated Resistance to EGFR Inhibitors: An Old Liaison Rooted in Colorectal Cancer Stem Cells. Cancer. 2014;74(14):3647-51.

65. Weihua Z, Tsan R, Huang WC, Wu Q, Chiu CH, Fidler IJ, et al. Survival of cancer cells is maintained by EGFR independent of its kinase activity. Cancer Cell. 2008;13(5):385-93.

66. Defize LH, Boonstra J, Meisenhelder J, Kruijer W, Tertoolen LG, Tilly BC, et al. Signal transduction by epidermal growth factor occurs through the subclass of high affinity receptors. J Cell Biol. 1989;109(5):2495-507.

67. Ozcan F, Klein P, Lemmon MA, Lax I, Schlessinger J. On the nature of low- and high-affinity EGF receptors on living cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(15):5735-40.

68. Ringerike T, Stang E, Johannessen LE, Sandnes D, Levy FO, Madshus IH. High-affinity binding of epidermal growth factor (EGF) to EGF receptor is disrupted by overexpression of mutant dynamin (K44A). J Biol Chem. 1998;273(27):16639-42.

69. Krall JA, Beyer EM, MacBeath G. High- and low-affinity epidermal growth factor receptor-ligand interactions activate distinct signaling pathways. PLoS One. 2011;6(1):0015945.

70. Sako Y, Minoghchi S, Yanagida T. Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. Nat Cell Biol. 2000;2(3):168-72.

71. Wang YN, Yamaguchi H, Hsu JM, Hung MC. Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins. Oncogene. 2010;29(28):3997-4006.

72. Han W, Lo HW. Landscape of EGFR signaling network in human cancers: biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations. Cancer Lett. 2012;318(2):124-34.

73. Wang YN, Yamaguchi H, Huo L, Du Y, Lee HJ, Lee HH, et al. The translocon Sec61beta localized in the inner nuclear membrane transports membrane-embedded EGF receptor to the nucleus. J Biol Chem. 2010;285(49):38720-9.

74. Hirota CL, Moreau F, Iablokov V, Dicay M, Renaux B, Hollenberg MD, et al. Epidermal growth factor receptor transactivation is required for proteinase-activated receptor-2-induced COX-2 expression in intestinal epithelial cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2012;303(1):19.

75. Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. Nat Cell Biol. 2001;3(9):802-8.

76. Brand TM, Iida M, Luthar N, Starr MM, Huppert EJ, Wheeler DL. Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. Radiother Oncol. 2013;108(3):370-7.

77. Huang WC, Chen YJ, Li LY, Wei YL, Hsu SC, Tsai SL, et al. Nuclear translocation of epidermal growth factor receptor by Akt-dependent phosphorylation enhances breast cancer-resistant protein expression in gefitinib-resistant cells. J Biol Chem. 2011;286(23):20558-68.

78. Dittmann K, Mayer C, Rodemann HP. Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity. Radiother Oncol. 2005;76(2):157-61.

79. Liccardi G, Hartley JA, Hochhauser D. EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. Cancer Res. 2011;71(3):1103-14.

80. Li C, Iida M, Dunn EF, Ghia AJ, Wheeler DL. Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. Oncogene. 2009;28(43):3801-13.

81. Hsu SC, Miller SA, Wang Y, Hung MC. Nuclear EGFR is required for cisplatin resistance and DNA repair. Am J Transl Res. 2009;1(3):249-58.

82. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. 2005;353(2):123-32.

83. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. N Engl J Med. 2009;361(10):947-57.

84. Fumoleau P, Campone M, Coudert B, Mayer F, Favier L, Ferrant E. [Targeting ErbB receptors in breast cancer]. Bull Cancer. 2007;94(7 Suppl):F147-70.

85. Boccaccio C, Gaudino G, Cilli M, Mondino A, Comoglio PM. Ligand-independent tyrosine phosphorylation of the receptor encoded by the c-neu oncogene. Growth Factors. 1991;5(3):233-42.

86. Swain SM, Kim SB, Cortes J, Ro J, Semiglazov V, Campone M, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. Lancet Oncol. 2013;14(6):461-71.

87. Martin V, Cappuzzo F, Mazzucchelli L, Frattini M. HER2 in solid tumors: more than 10 years under the microscope; where are we now? Future Oncol. 2014;10(8):1469-86.

88. Landi L, Cappuzzo F. HER2 and lung cancer. Expert Rev Anticancer Ther. 2013;13(10):1219-28.

89. Lu Y, Jingyan G, Baorong S, Peng J, Xu Y, Cai S. Expression of EGFR, Her2 predict lymph node metastasis (LNM)-associated metastasis in colorectal cancer. Cancer. 2012;11(5):219-26.

90. Bertotti A, Migliardi G, Galimi F, Sassi F, Torti D, Isella C, et al. A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts ("xenopatients") identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer. Cancer Discov. 2011;1(6):508-23.

91. Sorscher SM. Marked response to single agent trastuzumab in a patient with metastatic HER-2 gene amplified rectal cancer. Cancer. 2011;29(7):456-9.

92. Amin DN, Campbell MR, Moasser MM. The role of HER3, the unpretentious member of the HER family, in cancer biology and cancer therapeutics. Semin Cell Dev Biol. 2010;21(9):944-50.

93. Koutras AK, Fountzilas G, Kalogeras KT, Starakis I, Iconomou G, Kalofonos HP. The upgraded role of HER3 and HER4 receptors in breast cancer. Crit Rev Oncol Hematol. 2010;74(2):73-8.

94. Sartor CI, Zhou H, Kozlowska E, Guttridge K, Kawata E, Caskey L, et al. Her4 mediates ligand-dependent antiproliferative and differentiation responses in human breast cancer cells. Mol Cell Biol. 2001;21(13):4265-75.

95. Naresh A, Long W, Vidal GA, Wimley WC, Marrero L, Sartor CI, et al. The ERBB4/HER4 intracellular domain 4ICD is a BH3-only protein promoting apoptosis of breast cancer cells. Cancer Res. 2006;66(12):6412-20.

96. Kainulainen V, Sundvall M, Maatta JA, Santiestevan E, Klagsbrun M, Elenius K. A natural ErbB4 isoform that does not activate phosphoinositide 3-kinase mediates proliferation but not survival or chemotaxis. J Biol Chem. 2000;275(12):8641-9.

97. Lau C, Killian KJ, Samuels Y, Rudloff U. ERBB4 mutation analysis: emerging molecular target for melanoma treatment. Methods Mol Biol. 2014;1102:461-80.

98. Ljuslinder I, Malmer B, Isaksson-Mettavainio M, Oberg A, Henriksson R, Stenling R, et al. ErbB 1-4 expression alterations in primary colorectal cancers and their corresponding metastases. Anticancer Res. 2009;29(5):1489-94.

99. Soung YH, Lee JW, Kim SY, Wang YP, Jo KH, Moon SW, et al. Somatic mutations of the ERBB4 kinase domain in human cancers. Int J Cancer. 2006;118(6):1426-9.

100. Rokavec M, Justenhoven C, Schroth W, Istrate MA, Haas S, Fischer HP, et al. A novel polymorphism in the promoter region of ERBB4 is associated with breast and colorectal cancer risk. Clin Cancer Res. 2007;13(24):7506-14.

101. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. J Cell Sci. 2005;118(Pt 5):843-6.

102. Pratilas CA, Solit DB. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. Clin Cancer Res. 2010;16(13):3329-34.

103. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. J Comput Chem. 2004;25(13):1605-12.

104. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. Nat Rev Cancer. 2009;9(8):550-62.

105. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. Adv Cancer Res. 2009;102:19-65.

106. Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. Adv Cancer Res. 2005;94:29-86.

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

108. Planchard D, Loriot Y, Besse B. [Impact of KRAS in standard treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients in 2009: prognostic and predictive value]. Bull Cancer. 2009;96(Suppl):S57-68.

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

110. Beeram M, Patnaik A, Rowinsky EK. Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer. J Clin Oncol. 2005;23(27):6771-90.

111. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004;5(11):875-85.

112. Halilovic E, Solit DB. Therapeutic strategies for inhibiting oncogenic BRAF signaling. Curr Opin Pharmacol. 2008;8(4):419-26.

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

114. Karakas B, Bachman KE, Park BH. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. Br J Cancer. 2006;94(4):455-9.

115. Samuels Y, Velculescu VE. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. Cell Cycle. 2004;3(10):1221-4.

116. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. Cancer Res. 2009;69(5):1851-7.

117. Prenen H, De Schutter J, Jacobs B, De Roock W, Biesmans B, Claes B, et al. PIK3CA mutations are not a major determinant of resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab in metastatic colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2009;15(9):3184-8.

118. Tol J, Dijkstra JR, Klomp M, Teerenstra S, Dommerholt M, Vink-Borger ME, et al. Markers for EGFR pathway activation as predictor of outcome in metastatic colorectal cancer patients treated with or without cetuximab. Eur J Cancer. 1997;46(11):1997-2009.

119. Zhu K, Yan H, Wang R, Zhu H, Meng X, Xu X, et al. Mutations of KRAS and PIK3CA as independent predictors of distant metastases in colorectal cancer. Med Oncol. 2014;31(7):014-0016.

120. Blons H, Rouleau E, Charrier N, Chatellier G, Cote JF, Pages JC, et al. Performance and cost efficiency of KRAS mutation testing for metastatic colorectal cancer in routine diagnosis: the MOKAECM study, a nationwide experience. PLoS One. 2013;8(7):e68945.

121. Harle A, Dubois C, Rouyer M, Merlin JL. [Method validation according to ISO 15189 and SH GTA 04: application for the detection of KRAS mutations using PCR TaqMan assay]. Ann Biol Clin. 2013;71(5):603-7.

122. Tougeron D, Lecomte T, Pages JC, Villalva C, Collin C, Ferru A, et al. Effect of low-frequency KRAS mutations on the response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. Ann Oncol. 2013;24(5):1267-73.

123. Harle A, Lion M, Lozano N, Merlin JL. [Clinical, diagnostic significance and theranostic interest of PIK3CA gene mutations in breast cancer]. Bull Cancer. 2013;100(10):947-54.

124. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. Ca. 2011;61(2):69-90.

125. De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, et al. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. Ann Oncol. 2008;19(3):508-15.

126. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, et al. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. J Clin Oncol. 2007;25(22):3230-7.

127. Custodio A, Feliu J. Prognostic and predictive biomarkers for epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer: beyond KRAS mutations. Crit Rev Oncol Hematol. 2013;85(1):45-81.

128. Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, Buc E, Bachet JB, Lecomte T, et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. J Clin Oncol. 2009;27(35):5924-30.

129. Perkins G, Lievre A, Ramacci C, Meatchi T, de Reynies A, Emile JF, et al. Additional value of EGFR downstream signaling phosphoprotein expression to KRAS status for response to anti-EGFR antibodies in colorectal cancer. Int J Cancer. 2010;127(6):1321-31.

130. Chergui F, Chretien AS, Bouali S, Ramacci C, Rouyer M, Bastogne T, et al. Validation of a phosphoprotein array assay for characterization of human tyrosine kinase receptor downstream signaling in breast cancer. Clin Chem. 2009;55(7):1327-36.

131. Harrell FE, Jr., Lee KL, Mark DB. Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. Stat Med. 1996;15(4):361-87.

132. Sauerbrei W, Schumacher M. A bootstrap resampling procedure for model building: application to the Cox regression model. Stat Med. 1992;11(16):2093-109.

133. Iwamoto S, Hazama S, Kato T, Miyake Y, Fukunaga M, Matsuda C, et al. Multicenter phase II study of second-line cetuximab plus folinic acid/5-fluorouracil/irinotecan (FOLFIRI) in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: the FLIER study. Anticancer Res. 2014;34(4):1967-73.

134. Razis E, Pentheroudakis G, Rigakos G, Bobos M, Kouvatseas G, Tzaida O, et al. EGFR gene gain and PTEN protein expression are favorable prognostic factors in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. J Cancer Res Clin Oncol. 2014;140(5):737-48.

135. Mirzoeva OK, Das D, Heiser LM, Bhattacharya S, Siwak D, Gendelman R, et al. Basal subtype and MAPK/ERK kinase (MEK)-phosphoinositide 3-kinase feedback signaling determine susceptibility of breast cancer cells to MEK inhibition. Cancer Res. 2009;69(2):565-72.

136. Scartozzi M, Giampieri R, Maccaroni E, Mandolesi A, Biagetti S, Alfonsi S, et al. Phosphorylated AKT and MAPK expression in primary tumours and in corresponding metastases and clinical outcome in colorectal cancer patients receiving irinotecan-cetuximab. J Transl Med. 2012;10(71):1479-5876.

137. Saglam O, Garrett CR, Boulware D, Sayegh Z, Shibata D, Malafa M, et al. Activation of the serine/threonine protein kinase AKT during the progression of colorectal neoplasia. Clin Colorectal Cancer. 2007;6(9):652-6.

138. De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. Lancet Oncol. 2011;12(6):594-603.

139. Jeong WJ, Cha PH, Choi KY. Strategies to overcome resistance to epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy in metastatic colorectal cancer. World. 2014;20(29):9862-71.

140. Agarwal E, Chaudhuri A, Leiphrakpam PD, Haferbier KL, Brattain MG, Chowdhury S. Akt inhibitor MK-2206 promotes anti-tumor activity and cell death by modulation of AIF and Ezrin in colorectal cancer. BMC Cancer. 2014;14(145):1471-2407.

141. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 2010;362(24):2260-70.

142. Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 2010;362(24):2251-9.

143. Yang X, Yang K, Kuang K. The efficacy and safety of EGFR inhibitor monotherapy in non-small cell lung cancer: a systematic review. Curr Oncol Rep. 2014;16(6):014-0390.

144. Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. N Engl J Med. 2012;367(18):1694-703.

145. Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. N Engl J Med. 2012;367(19):1783-91.

146. Narita Y, Taniguchi H, Komori A, Nitta S, Yamaguchi K, Kondo C, et al. CA19-9 level as a prognostic and predictive factor of bevacizumab efficacy in metastatic colorectal cancer patients undergoing oxaliplatin-based chemotherapy. Cancer Chemother Pharmacol. 2014;73(2):409-16.

147. Hegde PS, Jubb AM, Chen D, Li NF, Meng YG, Bernaards C, et al. Predictive impact of circulating vascular endothelial growth factor in four phase III trials evaluating bevacizumab. Clin Cancer Res. 2013;19(4):929-37.

148. Cai J, Ma H, Huang F, Zhu D, Bi J, Ke Y, et al. Correlation of bevacizumab-induced hypertension and outcomes of metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab: a systematic review and meta-analysis. World J Surg Oncol. 2013;11(306):1477-7819.

149. Stiegelbauer V, Perakis S, Deutsch A, Ling H, Gerger A, Pichler M. MicroRNAs as novel predictive biomarkers and therapeutic targets in colorectal cancer. World J Gastroenterol 2014;20(33):11727-35.

150. Hansen TF, Nielsen BS, Sorensen FB, Johnsson A, Jakobsen A. Epidermal Growth Factor-like Domain 7 Predicts Response to First-Line Chemotherapy and Bevacizumab in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. Mol Cancer Ther. 2014;13(9):2238-45.

151. Polyak K. Tumor heterogeneity confounds and illuminates: a case for Darwinian tumor evolution. Nat Med. 2014;20(4):344-6.

152. Harle A, Busser B, Rouyer M, Harter V, Genin P, Leroux A, et al. Comparison of COBAS 4800 KRAS, TaqMan PCR and high resolution melting PCR assays for the detection of KRAS somatic

mutations in formalin-fixed paraffin embedded colorectal carcinomas. Virchows Arch. 2013;462(3):329-35.

153. Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, Woo MS, Greulich H, Wong KK, et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(6):2070-5.

154. Hofman V, Ilie M, Gavric-Tanga V, Lespinet V, Mari M, Lassalle S, et al. [Role of the surgical pathology laboratory in the pre-analytical approach of molecular biology techniques]. Ann Pathol. 2010;30(2):85-93.

155. West NP, Dattani M, McShane P, Hutchins G, Grabsch J, Mueller W, et al. The proportion of tumour cells is an independent predictor for survival in colorectal cancer patients. Br J Cancer. 2010;102(10):1519-23.

156. Improta G, Zupa A, Possidente L, Tartarone A, Pedicini P, Nappi A, et al. Coexistence of two different mutations in codon 12 of the Kras gene in colorectal cancer: Report of a case supporting the concept of tumoral heterogeneity. Oncol Lett. 2013;5(5):1741-3.

157. Vider BZ, Zimber A, Chastre E, Prevot S, Gespach C, Estlein D, et al. Evidence for the involvement of the Wnt 2 gene in human colorectal cancer. Oncogene. 1996;12(1):153-8.

158. Abdelmaksoud-Dammak R, Miladi-Abdennadher I, Saadallah-Kallel A, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Frikha M, et al. Downregulation of WIF-1 and Wnt5a in patients with colorectal carcinoma: clinical significance. Tumour Biol. 2014;35(8):7975-82.

159. Sebio A, Kahn M, Lenz HJ. The potential of targeting Wnt/beta-catenin in colon cancer. Expert Opin Ther Targets. 2014;18(6):611-5.

160. Slattery ML, Lundgreen A, Kadlubar SA, Bondurant KL, Wolff RK. JAK/STAT/SOCS-signaling pathway and colon and rectal cancer. Mol Carcinog. 2013;52(2):155-66.

161. Gordziel C, Bratsch J, Moriggl R, Knosel T, Friedrich K. Both STAT1 and STAT3 are favourable prognostic determinants in colorectal carcinoma. Br J Cancer. 2013;109(1):138-46.

162. Nagaraju GP, Park W, Wen J, Mahaseth H, Landry J, Farris AB, et al. Antiangiogenic effects of ganetespib in colorectal cancer mediated through inhibition of HIF-1alpha and STAT-3. Angiogenesis. 2013;16(4):903-17.

163. Zhang L, Li J, Li L, Zhang J, Wang X, Yang C, et al. IL-23 selectively promotes the metastasis of colorectal carcinoma cells with impaired Socs3 expression via the STAT5 pathway. Carcinogenesis. 2014;35(6):1330-40.

164. Wang SW, Hu J, Guo QH, Zhao Y, Cheng JJ, Zhang DS, et al. AZD1480, a JAK inhibitor, inhibits cell growth and survival of colorectal cancer via modulating the JAK2/STAT3 signaling pathway. Oncol Rep. 2014;2014(10):3477.

165. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. Biochim Biophys Acta. 2007;1773(8):1358-75.

166. de la Cruz-Morcillo MA, Valero ML, Callejas-Valera JL, Arias-Gonzalez L, Melgar-Rojas P, Galan-Moya EM, et al. P38MAPK is a major determinant of the balance between apoptosis and autophagy triggered by 5-fluorouracil: implication in resistance. Oncogene. 2012;31(9):1073-85.

167. van Houdt WJ, de Bruijn MT, Emmink BL, Raats D, Hoogwater FJ, Borel Rinkes IH, et al. Oncogenic K-ras activates p38 to maintain colorectal cancer cell proliferation during MEK inhibition. Cell. 2010;32(4):245-57.

168. Chiacchiera F, Grossi V, Cappellari M, Peserico A, Simonatto M, Germani A, et al. Blocking p38/ERK crosstalk affects colorectal cancer growth by inducing apoptosis in vitro and in preclinical mouse models. Cancer Lett. 2012;324(1):98-108.

169. Lecomte T, Berger A, Zinzindohoue F, Micard S, Landi B, Blons H, et al. Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. Int J Cancer. 2002;100(5):542-8.

170. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. Nature. 2012;486(7404):532-6.

171. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. Nat Med. 2014;20(4):430-5.

172. Kalikaki A, Politaki H, Souglakos J, Apostolaki S, Papadimitraki E, Georgoulia N, et al. KRAS Genotypic Changes of Circulating Tumor Cells during Treatment of Patients with Metastatic Colorectal Cancer. PLoS One. 2014;9(8):2014.

173. Bork U, Grutzmann R, Rahbari NN, Scholch S, Distler M, Reissfelder C, et al. Prognostic relevance of minimal residual disease in colorectal cancer. World J Gastroenterol. 2014;20(30):10296-304.

174. Chen P, Xi Q, Wang Q, Wei P. Downregulation of microRNA-100 correlates with tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer. Med Oncol. 2014;31(10):235.

175. Molina-Pinelo S, Carnero A, Rivera F, Estevez-Garcia P, Bozada JM, Limon ML, et al. MiR-107 and miR-99a-3p predict chemotherapy response in patients with advanced colorectal cancer. BMC Cancer. 2014;14(1):656.

176. Manceau G, Imbeaud S, Thiebaut R, Liebaert F, Fontaine K, Rousseau F, et al. Hsa-miR-31-3p expression is linked to progression-free survival in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy. Clin Cancer Res. 2014;20(12):3338-47.

177. Wiechers IR, Perin NC, Cook-Deegan R. The emergence of commercial genomics: analysis of the rise of a biotechnology subsector during the Human Genome Project, 1990 to 2004. Genome Med. 2013;5(9):2013.

178. Hamfjord J, Stangeland AM, Hughes T, Skrede ML, Tveit KM, Ikdahl T, et al. Differential expression of miRNAs in colorectal cancer: comparison of paired tumor tissue and adjacent normal mucosa using high-throughput sequencing. PLoS One. 2012;7(4):17.

179. Wang HY, Yan LX, Shao Q, Fu S, Zhang ZC, Ye W, et al. Profiling plasma microRNA in nasopharyngeal carcinoma with deep sequencing. Clin Chem. 2014;60(5):773-82.

180. Yoshimura Y, Tomita M, Mizutani F, Yasukawa T. Cell pairing using microwell array electrodes based on dielectrophoresis. Anal Chem. 2014;86(14):6818-22.

Le cancer colorectal est le troisième cancer le plus répandu dans le monde avec plus d'un million de patients diagnostiqués chaque année, dont 50% auront une évolution métastatique de leur maladie. Les récentes études pour améliorer les traitements du cancer colorectal métastatique (CCRm) ont permis le développement d'anticorps monoclonaux, le cetuximab et le panitumumab, capables d'inhiber l'activation des récepteurs au facteur de croissance épidermique (EGFR) et les voies de signalisation en aval (RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT/mTOR), responsables de la croissance cellulaire, la prolifération, l'inhibition de l'apoptose, l'invasion et de l'évolution métastatique. Cependant, dans les études incluant des patients dont les tumeurs sont « *RAS* sauvage », c'est à dire exemptes de mutation des gènes *KRAS* et *NRAS*, le taux de réponse aux thérapies à base de cetuximab ou du panitumumab sont de l'ordre de 40 à 60% seulement, ce qui signifie qu'une grande partie des patients traités échappent au traitement par le biais d'autres mécanismes. La présence d'altérations d'autres gènes comme *PIK3CA*, *BRAF* est responsable en partie des cas où les patients ne présentent pas de réponse. De plus, la surexpression ou l'altération de protéine comme PTEN, PI3K, AKT impliquées dans les voies de signalisation RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT/mTOR peuvent avoir un impact significatif sur la prolifération cellulaire ou l'apoptose. L'absence ou la surexpression des protéines sous leur forme active phosphorylée pourrait présenter un intérêt pour prédire la réponse aux anti-EGFR chez les patients dont les tumeurs sont « *RAS* sauvage ».

Dans ce travail, nous avons tout d'abord développé des techniques pour le génotypage des gènes *RAS* et *PIK3CA* à partir d'échantillons de tumeurs colorectales fixées au formol et incluses en paraffine, puis dans un second temps, nous avons validé ces méthodes selon la norme ISO 15189, puis dans un dernier temps, nous avons étudié l'expression des phosphoprotéines en aval des récepteurs à l'EGF ainsi que les statuts mutationnels des gènes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* à partir de 100 échantillons de tumeurs congelées issues de patients atteints d'un CCRm et traités par un anti-EGFR.

Sur 100 échantillons de tumeurs, 60 ne présentaient pas de mutation des gènes *RAS*. Parmi les patients dont les tumeurs ne présentaient pas de mutation des gènes *RAS*, 45,0% présentaient une réponse tumorale partielle ou complète et 55,0% étaient en maladie stable ou évolutive lorsqu'ils étaient traités par un anti-EGFR. Les patients dont les tumeurs présentaient une mutation des gènes RAS avaient une survie sans progression (PFS) significativement plus faible (HR=3.04 [1.91; 4.83];p<0.001) ainsi qu'une survie globale (OS) plus faible (HR=2.49 [1.56; 3.97];p<0.001). La PFS et la survie globale (OS) étaient significativement plus élevées chez les patients dont les tumeurs étaient « *RAS* sauvage ». L'expression de pAKT, pERK1/2 et pMEK1 étaient significativement plus faibles chez les patients dont les tumeurs étaient sauvages que chez les patients présentant des tumeurs *RAS* mutées (p=0,0246 ; p=0,004 ; p=0,0110 respectivement) et aucune différence significative d'expression entre les tumeurs *RAS* sauvage et *RAS* mutées n'a été démontrée pour pEGFR, pGSK3, pIGFR et pP90SRK. Chez les patients présentant des tumeurs *RAS* sauvage, le taux de réponse était significativement supérieur pour les tumeurs surexprimant pEGFR et pAKT au dessus des seuils calculés (p=0,0258 et p=0,0277 respectivement). Aucune différence significative n'a été trouvée entre le taux de réponse et l'expression des autres phosphoprotéines.

Notre étude montre qu'associer la mesure de l'expression des phosphoprotéines de signalisation en aval d'EGFR, à l'analyse du statut mutationnel des gènes *RAS, BRAF, PIK3CA* pourrait présenter un intérêt dans la prédiction de la réponse aux thérapies anti-EGFR chez les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique.

Colorectal cancer is the third most common cancer worldwide with more than one million patients diagnosed each year, among 50% will develop metastatic disease. Recent efforts to improve the treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC) has led to the development of monoclonal antibodies such as cetuximab and panitumumab, that inhibit the activation of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and its downstream pathways (namely RAS/RAF/MAPK and PI3K/AKT/mTOR) that promote cell growth, proliferation, inhibition of apoptosis, invasion and metastasis. However, from studies including "*RAS* wild-type" i.e. *KRAS* and *NRAS* wild-type tumors, the response rates to cetuximab or panitumumab therapy ranged from only 40 to 60% which results in a large fraction of patients without any known causes for treatment failure. The presence of alterations in other genes such as *PIK3CA* or *BRAF* in the EGFR-dependent signaling pathways is responsible for some of the non-responding cases. Moreover, overexpression or alterations of proteins such as PTEN, PI3K, AKT, involved in the RAS/RAF/MAPK or PI3K/AKT/mTOR signaling pathways can have a significant impact on cell proliferation or apoptosis. Absence or overexpression of proteins under their active phosphorylated forms may be of interest to predict response to anti-EGFR in *RAS* wild-type patients.

In this work, we first developed assays to assess *RAS* and *PIK3CA* mutations in formalin fixed paraffin embedded colorectal tumors, then we validated these assays according to ISO 15189 and we finally studied expression of downstream signalling phosphoproteins and *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* status in 100 frozen samples of patients with mCRC and treated with anti-EGFR.

Among the 100 tumor samples, 60 were *RAS* wild-type. Among the *RAS* wild-type patients, 45.0% achieved a complete or partial response, and 55.0% had a stable disease or progression (p<0.001) when treated with anti-EGFR. Patients with a *RAS* mutation had significant lower progression-free survival (PFS) (HR=3.04[1.91; 4.83];p<0.001) and overall survival (OS) (HR=2.49[1.56; 3.97];p<0.001). PFS and OS were significantly higher in *RAS* wild-type patients. Expression of pAKT, pERK1/2 and pMEK1 was significantly lower in *RAS* wild-type patients than in *RAS* mutated patients (p=0.0246; p=0.004; p=0.0110 respectively) and no significant difference was observed between *RAS* wild-type and *RAS* mutated tumors in the expression of pEGFR, pGSK3, pIGFR, pP70S6K and pP90SRK. In *RAS wild-type* patients, response rate was significantly higher for tumors that overexpressed pEGFR and pAKT above the calculated threshold (p=0.0258 and p=0.0277 respectively). No significant relation was found between response rate and the level of expression of the other phosphoproteins.

Our study shows that combining the analysis of the expression of EGFR downstream signalling phosphoproteins, *RAS*, *BRAF* or *PIK3CA* status could be of interest to predict the response to anti-EGFR therapies in patients with mCRC.