

La biopsie liquide dans le cancer du poumon

Liquid biopsy in lung cancer

Mona Mlika¹, Paul Hofman², Chadli Dziri³, Faouzi Mezni¹

1-Service d'anatomopathologique, Hôpital Abderrahman Mami Ariana /Université Tunis el Manar,

2-Nice / hôpital Pasteur

3-Service de chirurgie générale, hôpital Charles Nicolle/ université Tunis el Manar

RÉSUMÉ

A l'ère de la médecine personnalisée, il ne suffit plus de faire un typage précis du cancer du poumon mais il faut détecter le substratum moléculaire et les éventuelles voies de la carcinogénèse pouvant être ciblées. Les principales cibles thérapeutiques sont représentées par les gènes EGFR, ALK-EML4, ROS1, Her2Neu et BRAF. La recherche de ces cibles se fait dans 80% des cas sur des prélèvements biopsiques et environ 30% des patients ne peuvent pas bénéficier de ces analyses. Cela peut être dû à l'épuisement du matériel tumoral durant les différentes étapes de diagnostic morphologique ou immunohistochimique ou la biopsie semble contre-indiquée ou difficile à réaliser. De plus, les cellules tumorales ont tendance à contrecarrer les traitements qui les ciblent en activant d'autres voies de la carcinogénèse qui étaient au moment du diagnostic minoritaires. Ceci est à l'origine de phénomènes de résistance qui apparaissent dans les 3 à 6 mois suivant l'introduction du traitement. Afin de pallier à tous ces événements, la biopsie liquide a été développée. Il s'agit d'un simple prélèvement sanguin de 5 à 10 ml qui permet d'explorer les cellules tumorales circulantes, l'ADN tumoral circulant, l'ARN tumoral, les exosomes et les sécrétomes. Dans cette mise au point, nous nous proposons de définir la biopsie liquide, les principales méthodes d'investigation, ses intérêts, ses limites et son avenir en Tunisie.

Mots-clés

Biopsie liquide, ADN tumoral circulant, exosomes.

SUMMARY

In the era of the personalized medicine, we need not only to an accurate diagnosis of lung cancer but also to assess the molecular pathways involved in order to target them. The most relevant targets in lung cancer are the genes EGFR, ALK-EML4, ROS1, Her2Neu, BRAF. Mutations or translocations of these genes are performed on biopsies in 80% of the cases and 30% of the patients cannot have their molecular tests done. This may be due to the lack of tumor samples secondary to the morphologic and immunohistochemical techniques, contraindication to biopsy or difficulties to biopsy. Besides, tumor cells tend to activate other pathways that weren't activated at the onset in order to escape to therapeutic drugs. This phenomenon of resistance is observed 3 to 6 months after the onset of the treatment. In order to escape all these limitations, liquid biopsy was developed. It consists in a simple blood sample of 5 to 10 ml in which circulating tumor cells, circulating tumor DNA, tumor RNA, exosomes and secretomes are explored. In this paper, we tried to define liquid biopsy, to highlight the means of diagnosis, its limits, its advantages and its perspectives in Tunisia.

Key- words

Liquid biopsy, circulating tumoral DNA, exosomes.

Le cancer du poumon représente la première cause de mortalité par cancer dans le monde et en Tunisie où son incidence standardisée est estimée à 30/100000 habitants selon le registre des cancers du Nord de la Tunisie de 2004-2006. Le diagnostic positif de ce cancer se base sur le diagnostic anatomopathologique. Le type histologique désormais le plus fréquent est l'adénocarcinome (1). Ce dernier représente dans notre service depuis 2009, 61% des cancers non à petites cellules. A l'ère de la médecine personnalisée, ce type histologique a bénéficié des progrès de la pathologie moléculaire qui ont permis de mettre en évidence des voies de carcinogénèse activées et pouvant être ciblées (2)(3). Cependant, le cancer du poumon est caractérisé par une grande hétérogénéité spatiale et temporelle. L'hétérogénéité spatiale intra-tumorale est représentée par la mise en évidence de différentes voies oncogéniques mutées dans différentes zones d'une même tumeur (4). Cette hétérogénéité a été à l'origine des recommandations stipulant la nécessité d'effectuer plusieurs prélèvements au niveau de la tumeur. L'hétérogénéité temporelle est représentée par la variabilité des voies mutées entre les tumeurs primitives et les récives locales ou les métastases nécessitant de biopsier les différents sites métastatiques afin d'orienter le traitement. Le gold standard pour la mise en évidence des cibles thérapeutiques est représenté par les prélèvements tissulaires. Cependant, même si 80% des carcinomes non à petites cellules (CNPC) sont biopsiés les prélèvements tissulaires ne permettent pas de réaliser des analyses moléculaires dans 31% des cas. Ceci peut être dû à la non accessibilité des lésions ou à des contre-indications aux biopsies (5). Dans les essais en phase 3 IPASS et INTEREST, les prélèvements tissulaires n'étaient pas disponibles dans respectivement 42% et 31% des cas afin d'orienter le traitement (6)(7). De plus, d'après les recommandations du collège des pathologistes Américains, la recherche des mutations de l'EGFR nécessiterait des prélèvements comportant environ 50% de cellules tumorales. Avec des méthodes très sensibles, un seuil de 10% de cellules tumorales est suffisant (6). La fixation au formol, qui est obligatoire afin de préserver les tissus de l'autolyse, est à l'origine de transitions C>T/G>A dans 1 à 25% des allèles pouvant être à l'origine de faux positifs (4).

La biopsie liquide a marqué un nouveau tournant dans la médecine personnalisée et a suscité un grand intérêt médiatique (8). En effet, les tumeurs contenant 50 millions de cellules tumorales sont capables de libérer dans le sang des quantités d'ADN tumoral circulant détectables. Ce seuil de détection est meilleur, selon certains auteurs, que celui du Pet-scan qui permet de détecter des lésions de 7 à 10 mm contenant environ 1 billion de cellules tumorales. Cet intérêt est également légitimé par l'apparente simplicité de cette technique. De plus, en 2014, les bons résultats des biopsies liquides ont

été à l'origine de leur intégration comme moyen de prélèvement chez les patients ne disposant pas de prélèvements tissulaires et candidats à la prise de TKI anti-EGFR de première et deuxième génération (afatinib, erlotinib, gefitinib (IRESSA (R)) afin de détecter la mutation T790M répondant aux EGFR-TKI de 3^{ème} génération (9) (10). Alegre et ses collaborateurs ont révélé dans une étude à propos de 36 patients que la biopsie liquide avait permis de mettre en évidence des mutations de l'EGFR non détectées dans les tissus dans 34% des cas (8). De plus, en 2016, la United States Food and Drug Administration (FDA) a approuvé une plateforme pour la mise en évidence des mutations de l'EGFR dans le plasma (11). Prélever 10 ml de sang à un patient dans un tube EDTA et émettre des résultats concernant le profil génomique de la tumeur en moins de 4 heures semble enthousiasmant mais la réalité est beaucoup plus nuancée.

Notre objectif était de définir la biopsie liquide, de mettre en évidence ses principaux intérêts, ses limites et ses perspectives.

Qu'elle est la définition de la biopsie liquide ?

La biopsie liquide est définie par la mise en évidence de cellules tumorales circulantes, d'ADN libre circulant (cf DNA) incluant l'ADN tumoral circulant (ctDNA), les ARN circulants (cf RNA) et les exosomes et ce dans le sang, les urines ou le liquide céphalo-rachidien (12). Ces dernières années ont vu surgir un grand intérêt pour le sécrétome tumoral c'est à dire l'ensemble des protéines détectées dans le sang et interférant avec les cellules tumorales ou le système immunitaire. La figure 1 représente les différents constituants de la biopsie liquide.

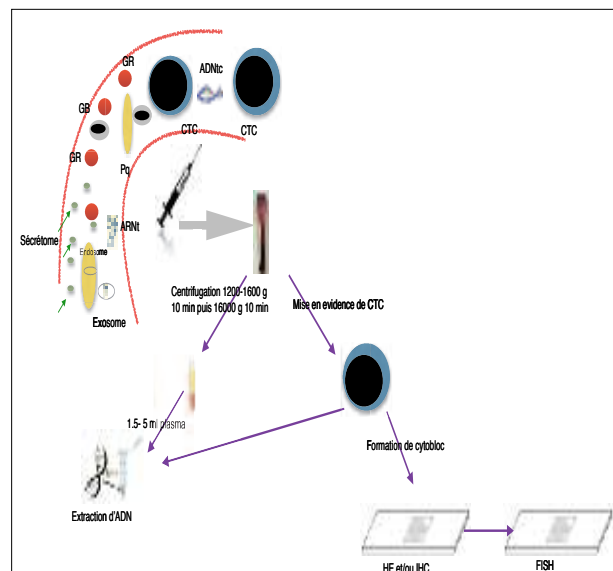


Figure 1: Les principaux constituants de la biopsie liquide

Abréviations: CTC: cellules tumorales circulantes, GR: globules rouges, GB: globules blancs, Pq: plaquettes, ADNc: ADN tumoral circulant, ARNt: ARN tumoral, HE: hématoxyline éosine, IHC: immunohistochimie.

Dans le cadre de cette mise au point, nous allons focaliser sur les prélèvements sanguins.

- Les cellules tumorales circulantes (CTC) sont des cellules non hématopoïétiques qui ont toutes les caractéristiques morphologiques des cellules tumorales (taille du noyau, rapport nucléo-cytoplasmique) et qui sont mises en évidence dans le sang. Elles sont isolées ou agencées en agrégats formant des microembolus tumoraux circulants. Les CTC sont très rares dans le sang. En effet, on y observe une CTC/ 10^6 - 10^7 leucocytes (13). Les microembolus tumoraux circulants renferment moins de marqueurs apoptotiques que les CTC ce qui est à l'origine d'une plus grande résistance et survie. La détection de ces microembolus serait associée à un mauvais pronostic (10).

- L'ADN circulant est composé de petits fragments d'ADN non associés à des cellules issus de l'apoptose et de la nécrose cellulaire mais également de cellules normales libérées dans le sang (4). Deux principaux mécanismes sont à l'origine de l'ADN tumoral circulant : actif et passif. Le mécanisme passif est représenté par le relargage de l'ADN par des cellules nécrotiques ou apoptotiques ou une digestion des cellules tumorales par les macrophages dans le sang (14). Le taux de l'ADN libre circulant a longtemps été considéré comme un facteur de mauvais pronostic chez les patients présentant un CNPC. Cependant, l'ADN libre circulant a été détecté en grandes quantités chez des patients diabétiques ou présentant des désordres cardio-vasculaires, hépatiques ou infectieux (14). Une infime partie de cet ADN (0.01%) correspond à de l'ADN tumoral circulant qui est détecté grâce à la mise en évidence de mutations oncogéniques pré-définies (15). Certaines études ont démontré la supériorité des analyses moléculaires réalisées sur l'ADNt par rapport aux CTC afin de détecter plus de mutations (13). Les avantages et les limites des CTC et de l'ADN tumoral circulant sont représentés dans le tableau 1 (14).

- Les ARN circulants sont relargués dans le sang par les cellules tumorales. Ils sont constitués par les ARN circulants non codants, les ARN-PIWI et les ARN longs non codants. Les plaquettes peuvent également libérer et séquestrer des acides nucléiques et peuvent donc servir comme source alternative des cfARN relargués par les cellules tumorales.

- L'ARN tumoral circulant correspond à de l'ARN issu de la nécrose des cellules tumorales.

- Les exosomes sont de petites vésicules (40-100 nm) qui dérivent des membranes plasmiques et sont déversées en extra-cellulaire après fusion de nombreux endosomes. Les exosomes sont libérés par les cellules normales et tumorales dans le sang (12). Ils contiennent des protéines de signalisation, des microARN, des mARN, des exoADN et des lipides. Les molécules contenues dans ces vésicules peuvent donc migrer dans le sang et permettre un échange d'information et de matériel avec des localisations distantes

(12). Les exosomes jouent un rôle important en interférant avec le micro-environnement cellulaire et en modulant la réponse immunitaire (12). Ce sont des éléments plus stables que l'ADN mais leur étude fait encore partie du domaine de la recherche et beaucoup de résultats prometteurs ont été rapportés (14,16).

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des CTC et de l'ADNt

ADNt	CTC
Avantages	
- Plus sensible pour la détection de phénomènes de résistance	- Identification morphologique des cellules tumorales
- Peut prédire une résistance acquise au traitement	- Important indicateur de risque de progression tumorale et de risque métastatique
- Peut changer les modalités thérapeutiques	- Permet de réaliser des études fonctionnelles in vivo et in vitro
	- Permet de réaliser des réactions d'hybridation in situ et d'analyse génomique
	- Peut indiquer chez les patients sous chimiothérapie une résistance au traitement
	- Influence les modalités thérapeutiques
Inconvénients	
- Beaucoup de faux positifs et négatifs	- Peu abondantes
- Pas d'intérêt dans les études fonctionnelles	- Nécessitent des techniques très sensibles
- Pas de standardisation des conditions pré-analytiques ni de consensus dans les techniques de séquençage.	- Beaucoup de faux positifs et négatifs
	- Hétérogénéité
	- Multiplicité des techniques de mise en évidence et absence de consensus.

Comment mettre en évidence les différents constituants de la biopsie liquide ?

- Les CTC sont mises en évidence grâce à deux groupes de méthodes : les méthodes anticorps dépendantes et les méthodes anticorps indépendantes avec une supériorité des dernières (10).

Les méthodes anticorps indépendantes se basent sur les critères morphologiques des cellules tumorales du point de vue taille, forme, critères nucléaires. Ces méthodes sont essentiellement représentées par les méthodes ScreenCell (France) (10) ou ISET (Rarecells Compagny, France). D'autres techniques sont représentées par les microfluidic chips qui consistent en une filtration du sang dans des micro-canaux afin d'isoler les CTC (13,17). Une autre technique basée sur la taille des cellules est représentée par le système de microcaviaty array qui a été exploré chez les patients présentant des résultats négatifs avec la technique cellsearch (18). Ce système est un filtre en nickel avec des cavités rectangulaires dont la taille et la porosité sont adaptées afin de détecter les CTC (13). Ces méthodes anticorps-indépendantes sont critiquées pour leur manque de reproductibilité. En effet, Freidin et ses collaborateurs ont rapporté des ratios de détection de 56 et 65% entre 2 pathologistes entraînés à la technique ScreenCell (19).

Les méthodes anticorps dépendantes sont représentées par la technique Cellsearch (Janssen Diagnostics Company, USA) qui a obtenu en 2016 l'agrément de la FDA en tant que méthode diagnostique ou la technique GILUPI cellcollector (20). La mise en évidence de ces cellules est basée sur des études immunohistochimiques par la détection de marqueurs épithéliaux (EpCam et cytokeratine). Les limites de ces techniques sont essentiellement représentées par l'hétérogénéité du cancer du poumon. En effet, les cellules tumorales peuvent perdre leurs marqueurs épithéliaux dans le cadre de la transition épithélio-mésenchymateuse, co-exprimer les 2 marqueurs ou n'exprimer que les marqueurs mésenchymateux. Ceci est à l'origine de beaucoup de faux négatifs. Cette étape de mise en évidence des différents constituants de la biopsie liquide est suivie d'une étape d'extraction de l'ADN/ARN et de séquençage à la recherche des principales cibles thérapeutiques.

- Concernant l'extraction de l'ADN/ARN, la plupart des auteurs ont recours à des kits d'extraction permettant d'assurer une bonne reproductibilité de la technique. Des mutations oncogéniques bien définies sont utilisées afin de mettre en évidence l'ADN tumoral. Cependant, de nombreuses études ont montré que des populations d'ADN tumoral de longueur variable peuvent être observées en raison des mécanismes d'apoptose versus nécrose (21). Afin de conserver l'ADN circulant, le tube de sang doit être centrifugé dans les 2 heures ou même les 30 minutes vu la dégradation rapide de l'ADN. En effet, après 2 heures, l'ADN leucocytaire est susceptible d'augmenter et de fausser les résultats (15). La taille moyenne de l'ADN circulant est de 166 pb mais elle peut être inférieure dans certains ADN tumoraux. De longs fragments d'ADN circulants (plusieurs Kb) sont supposés être secondaires à la nécrose tandis que les petits fragments sont secondaires à l'apoptose (5). L'objectif est donc de détecter les fragments courts d'ADN. Les techniques de PCR et de séquençage doivent être optimisées en conséquence (15).

- Les techniques de séquençage sont aussi variables que les publications qui se sont intéressées au sujet. Vu la faible quantité d'ADN tumoral circulant, les techniques classiques de séquençage comme le séquençage Sanger ou le pyroséquençage ne sont pas recommandées (22). Les techniques actuellement en vigueur peuvent être subdivisées en 2 grands groupes: les approches génomiques basées sur une réaction PCR (droplet digital PCR, BEAMing dPCR, mutant-enriched PCR, peptide nucleic acid locked nucleic acid PCR, SCORPION assay) et les approches non digitales et à haut débit (denaturing high performance liquid chromatography, la spectrométrie de masse). Le tableau 2 montre la plupart des techniques décrites. La pléthore de ces techniques est à l'origine d'une grande variabilité et hétérogénéité des résultats (5,15,21-28).. Cette variabilité est illustrée dans de rares méta-analyses par une grande hétérogénéité statistique

avec des spécificités variant de 88 à 97% et des sensibilités variant de 62 à 67.5% en comparaison avec les biopsies tissulaires (29). Le tableau 3 illustre les différentes sensibilités et spécificités recensées par certains auteurs (25,27,28,30-38). Cette différence peut être expliquée par des critères cliniques hétérogènes (stade tumoral, ethnie) mais également par la diversité des techniques. D'après les différentes méta-analyses, les meilleures techniques de séquençage semblent être basées sur le séquençage haut débit avec des sensibilités de 73 et 75% (5). Cependant, ces tests ne permettent pas de détecter les mutations rares (5). En effet, les mutations du gène EGFR détectées par ces techniques sont les mutations G719X de l'exon 18, Ex19 del, les mutations S768I, T790M, Ex20Ins de l'exon 20 et les mutations L858R et L861Q de l'exon 21 (11,39).

Quels sont les intérêts de la biopsie liquide?

- La mise en évidence des CTC a permis une meilleure connaissance de la pathophysiologie tumorale. En effet, il a été établi que les CTC n'étaient pas uniquement dotées d'un pouvoir métastatique mais qu'elles étaient également capables de coloniser le site de la tumeur primitive et de participer à la progression tumorale grâce à un phénomène de "tumor self-seeding » (4).

- Dans le domaine diagnostique du cancer du poumon les prélèvements tissulaires représentent encore le gold standard. En effet, ils permettent non seulement le diagnostic morphologique des tumeurs mais également la mise en évidence de différentes cibles thérapeutiques. Cependant, dans le cadre du diagnostic des cibles thérapeutiques, la biopsie liquide peut supplanter les prélèvements tissulaires en cas d'indisponibilité de matériel tumoral. La mise en évidence du site d'origine des métastases peut être établie grâce à une analyse génomique des CTC. Cependant, ces différentes méthodes sont difficiles à mettre en place dans le cadre de la routine (14) (2). La biopsie liquide ne peut en aucun cas remplacer la biopsie tissulaire.

- Dans le domaine thérapeutique, les biopsies liquides permettent de modifier le traitement en cas d'apparition de progression tumorale et de mettre en évidence des mécanismes de résistance qui sont représentés dans environ 60% des cas par l'acquisition de la mutation T790M (4). En effet, elles permettent le suivi des réponses thérapeutiques avant même l'apparition d'une récurrence clinique ou radiologique (4). Ces mutations sont sensibles aux inhibiteurs des tyrosines kinases anti-EGFR (EGFR-TKI) de troisième génération (TAGRISSO (R)). Par ailleurs, même sous EGFR-TKI de troisième génération, certains auteurs ont détecté des mutations tertiaires (L798I) ainsi que l'émergence de mutations activatrices du gène KRAS (40). Ces mutations sont traitement-dépendantes et ont été observées chez 30% et 2% des patients mis sous osimertinib et rociletinib respectivement. D'autres mutations, plus rares, sont

Tableau 2 : Principales techniques utilisées pour le séquençage

Technique	Description	Avantages	Inconvénients	Références
qPCR	réaction en chaîne par polymérase permettant de mesurer la quantité initiale d'ADN.	Faible cout, relativement facile à installer	Faible sensibilité pour ADNtc, uniquement mutations connues	(22)
Scorpion ARMS PCR	PCR temps réel utilisant un scorpion primer c'est à dire associant un fluorophore et un quencher	Relativement faible cout et sensibilité élevée	Détection de mutations connues	(24)
PNA-LNA PCR	PCR associant des PNA primers (acides nucléiques peptides) a des sondes LNA (acides nucléiques rattaches aux PNA) permettant d'amplifier uniquement l'ADN mute	Sensibilité élevée et un cout plus faible	Identification de mutations connues	(25)
NGS	Séquençage de plusieurs gènes en parallèle et à haut débit	Sensibilité élevée Détection de mutations rares	Cout élevé, complexe à installer en routine, bioinformatique indispensable	(26)
dPCR	PCR digitale permettant d'amplifier de courtes séquences d'ADN c	Sensibilité élevée -Peut détecter des gènes mutes dans 104 copies de gènes non mutes	Détection de mutations connues	(21)
Mutant-enriched PCR	Amplification uniquement des séquences mutées en 2 étapes : amplification première de l'ADN mute et wild type puis digestion sélective de l'ADN wild type et amplification unique de l'ADN mute	-Excellente sensibilité	Détection de mutations connues	(27)
BEAMing	(beads, emulsion, amplification and magnetics) utilise des billes magnétiques fonctionnalisées avec des amorces complémentaires de l'ADN cible qui, une fois « recouvertes » de multiples copies de l'ADN cible initialement encapsulé, sont marquées par des fluorochromes et analysées en cytométrie en flux	-Sensibilité élevée -Détection de mutations rares	- Mise en place très complexe en routine	(22)
HRM (high resolution melting)	permettant la détection de mutations, de polymorphisme génétique et de différences épigénétiques dans des échantillons d'ADN double brin à partir de l'analyse des courbes de fusion à haute résolution ou High Resolution Melt (HRM)	-Relativement simple et peu couteuse en comparaison avec les autres techniques	- Application limitée pour l'ADNtc vu sa faible quantité	(22)
DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography)	Mutations détectées par la mise en évidence de différence entre les hétéroduplex (formation ADN muté et non muté) et les homoduplex (Formations d'ADN non muté)	Sensibilité élevée	- Pas de détection de mutations rares	(28)
Spectrométrie de masse	Technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique	-Permet l'analyse des exosomes	- Domaine de la recherche.	(22)

Tableau 3 : variation des sensibilités et spécificités dans différentes séries de la littérature

Auteurs, Année, effectif	Technique	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Références
Bai 2009 (230)	DHPLC	81,8	89,5	(44)
Douillard 2013 (652)	Digital PCR	65,7	99,8	(31)
He 2009 (18)	enriched mutant PCR	88,9	100	(32)
He 2016 (120)	ddPCR	75,5	100	(32)
Jiang 2011 (58)	mutant-enriched PCR	77,8	100	(25)
Kim HR 2013 (40)	PNA-mediated real-time PCR	17,1	100	(45)
Kim ST 2013 (57)	NGS	66,7	93,3	(35)
Kuang 2009 (43)	Scorpion	91,3	55	(35)
Que 2016 (121)	Mutant enriched PCR	77,3	87,0	(27)
Yang 2017 (107)	Cast PCR	56,4	94,2	(37)
Zhao 2013 (111)	dPCR	35,6	95,5	(38)
Zhu 2015 (172)	ddPCR	81,1	97,0	(38)

observées sous EGFR-TKI notamment une amplification du gène c-MET ciblée actuellement par les TKI anti-MET (crizotinib) ou une amplification du gène EGFR, une mutation du gène PIK3CA dans 5% des cas et une transformation en une carcinome à petites cellules dans 14% des cas (4).

L'intérêt actuel pour l'immunothérapie dans le cancer du poumon est de plus en plus croissant. Ceci est basé sur la mise en évidence de la place fondamentale des lymphocytes T exprimant la molécule de surface PD1 (programmed cell death 1) dans la reconnaissance et la destruction des cellules tumorales. La mise en évidence

des lymphocytes T exprimant le récepteur PD1 en biopsie liquide n'a pas démontré son intérêt dans le cancer du poumon. Certains auteurs ont rapporté son utilité dans le mélanome et ont suggéré l'intérêt de détecter chez certains patients les lymphocytes T PD1+ afin de les isoler, les multiplier et les réinjecter aux patients pour renforcer leur immunité (41).

- Dans le domaine pronostic, la mise en évidence d'un fort taux de cellules tumorales représente un facteur de mauvais pronostic (12) (34). Pour certains auteurs, il n'existe pas d'impact pronostique des CTC dans les stades avancés de cancer (10). La mise en évidence de mutations du gène de l'EGFR chez des patients sous EGFR-TKI est un indicateur de mauvais pronostic.

- Dans le domaine de la recherche, la capture de CTC viables a permis la mise en place de modèle de CTC-derived xenograft (CDX) pour l'étude des sensibilités de certains traitements (42).

- Les CTC comme moyen de dépistage ont été décrites dans certaines publications décrivant la détection de CTC chez des patients présentant des bronchopneumopathies chroniques obstructives sans tumeurs détectables cliniquement ou radiologiquement (43)

Place de la biopsie liquide dans la prise en charge des patients :

Ces nombreuses avancées réalisées dans le domaine de la médecine personnalisée avec ce nouveau concept de biopsie liquide ou de micro-environnement liquide ont permis d'améliorer la prise en charge des patients et ont suscité de nombreuses interrogations concernant la

réponse au traitement de patients ayant des analyses de plasma positives avec des analyses tissulaires négatives, le rôle exact du microenvironnement, l'hétérogénéité des CTC, la place de la recherche des mutations T790M chez les patients sous EGFR-TKI, la place de l'analyse de l'ADN dans les urines etc. En effet, Marchetti et ses collaborateurs ont mis en évidence sur des CTC, de nombreuses mutations différentes du gène EGFR dans 13% des cas démontrant ainsi l'hétérogénéité des CTC (26). En pratique, actuellement, 2 scénarios existent pour avoir recours aux biopsies liquides: les patients présentant un cancer du poumon avec des prélèvements insuffisants et les patients en progression sous une CT de première ligne à base d'EGFR.

Qu'en est il pour la Tunisie ?

Le profil moléculaire du cancer du poumon en Tunisie n'a pas été clairement établi et aucune étude de cohorte n'a été publiée à ce jour. Les quelques données recensées sont souvent le résultat d'analyses menées dans les pays Européens où les techniques sont ciblées sur des mutations connues chez les Européens et les Asiatiques. Par ailleurs, ces techniques très coûteuses dans un contexte économique actuellement difficile doivent être mûrement réfléchies et hiérarchisées avec une vision micro et macroéconomique de la santé. Un test diagnostique est prêt à être installé en routine après plusieurs étapes d'analyses de performance, de validation clinique, de l'utilité clinique et des implications éthiques, légales et sociales (16).

Références

1. Mlika M, Ayadi-kaddour A, Boudaya S, Laabidi S, Boussen H, Mezni F El. Formation médicale continue La nouvelle classification des adénocarcinomes pulmonaires proposée par la société Thoracique américaine et la société respiratoire Européenne : De nouvelles recommandations pour une meilleure prise en charge.
2. Mlika M, Ayadi-kaddour A, Laabidi S, Boudaya S, Boussen H, Mezni F El. Revue de la littérature Carcinogénèse des carcinomes bronchiques non a petites cellules et implications thérapeutiques. 2014;368-72.
3. Mlika M, Laabidi S, Afrit M, Boussen H, El Mezni F. Genomic classification of lung cancer: toward a personalized treatment. La Tunisie médicale [Internet]. 2015;93(6):339-44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26644092>
4. Ilié M, Hofman P. Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy? Transl Lung Cancer Res [Internet]. 2016;5(4):420-3. Available from: <http://tlcr.amegroups.com/article/view/8950/8064>
5. Bernabé R, Hickson N, Wallace A, Blackhall FH. What do we need to make circulating tumour DNA (ctDNA) a routine diagnostic test in lung cancer? Eur J Cancer. 2017;81:66-73.
6. Kim ES, Hirsh V, Mok T, Socinski MA, Gervais R, Wu YL, et al. Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomised phase III trial. Lancet [Internet]. Elsevier Ltd; 2008;372(9652):1809-18. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61758-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61758-4)
7. Dash PK, Gorantla S, Gendelman HE, Knibbe J, George P, Makarov E, et al. NIH Public Access. Quest. 2011;31(9):3148-57.
8. company-bets-catching-cancer-liquid-biopsy-n493711 @ www.nbc news.com [Internet]. Available from: http://www.nbc news.com/health/cancer /company-bets-catching-cancer-liquid-biopsy-n493711?cid=eml_onsite
9. Malapelle U, Pisapia P, Rocco D, Smeraglio R, di Spirito M, Bellevecine C, et al. Next generation sequencing techniques in liquid biopsy: focus on non-small cell lung cancer patients. Transl lung cancer Res [Internet]. 2016;5(5):505-10. Available from: <http://www.pubmed central.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=5099511&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
10. Chudasama D, Barr J, Beeson J, Beddow E, McGonigle N, Rice A, et al. Detection of Circulating Tumour Cells and Survival of Patients with Non-small Cell Lung Cancer. Anticancer Res [Internet]. 2017;37(1):169-73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28011487>
11. Brown P. The Cobas® EGFR Mutation Test v2 assay. Future Oncol [Internet]. 2016;12(4):451-2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26838018>
12. Rolfo C, Castiglia M, Hong D, Alessandro R, Mertens I, Baggerman G, et al. Liquid biopsies in lung cancer: The new ambrosia of researchers. Biochim Biophys Acta - Rev Cancer. Elsevier B.V.; 2014;1846(2):539-46.
13. Nurwidya F, Zaini J, Putra AC, Andarini S, Hudoyo A, Syahrudin E, et al. Circulating Tumor Cell and Cell-free Circulating Tumor DNA in Lung Cancer. © Chonnam Med J Chonnam Med J [Internet]. 2016;52:151-8. Available from: <http://dx.doi.org/10.4068/cmj.2016.52.3.151>
14. Ilie M, Hofman V, Long E, Bordone O, Selva E, Washetine K, et al. Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized

- medicine? *Ann Transl Med* [Internet]. 2014;2(11):107. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4245510&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
15. Sholl LM, Aisner DL, Allen TC, Beasley MB, Cagle PT, Capelozzi VL, et al. Liquid biopsy in lung cancer: A perspective from members of the pulmonary pathology society. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140(8):825–9.
 16. Reclusa P, Sirera R, Araujo A, Giallombardo M, Valentino A, Sorber L, et al. Exosomes genetic cargo in lung cancer: a truly Pandora's box. *Transl lung cancer Res* [Internet]. 2016;5(5):483–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27826529%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5099517>
 17. Chen H, Cao B, Sun B, Cao Y, Yang K, Lin Y-S, et al. Highly-sensitive capture of circulating tumor cells using micro- ellipse filters. *Sci Rep* [Internet]. Springer US; 2017;(February):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-00232-6>
 18. Hosokawa M, Kenmotsu H, Koh Y, Yoshino T, Yoshikawa T, Naito T, et al. Size-Based Isolation of Circulating Tumor Cells in Lung Cancer Patients Using a Microcavity Array System. *PLoS One*. 2013;8(6).
 19. Freidin MB, Tay A, Freydina D V., Chudasama D, Nicholson AG, Rice A, et al. An assessment of diagnostic performance of a filter-based antibody-independent peripheral blood circulating tumour cell capture paired with cytomorphic criteria for the diagnosis of cancer. *Lung Cancer* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2014;85(2):182–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.05.017>
 20. Gorges TM, Penkalla N, Schalk T, Joosse SA, Riethdorf S, Tucholski J, et al. Enumeration and Molecular Characterization of Tumor Cells in Lung Cancer Patients Using a Novel In Vivo Device for Capturing Circulating Tumor Cells. *Clin Cancer Res*. 2016;22(9):2197–206.
 21. Zhang H, Liu D, Li S, Zheng Y, Yang X, Li X, et al. Comparison of EGFR signaling pathway somatic DNA mutations derived from peripheral blood and corresponding tumor tissue of patients with advanced non-small-cell lung cancer using liquidchip technology. *J Mol Diagn* [Internet]. 2013;15(6):819–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23988622>
 22. Lin CC, Huang WL, Wei F, Su WC, Wong DT. Emerging platforms using liquid biopsy to detect EGFR mutations in lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn* [Internet]. 2015;15(11):1427–40. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4889428/pdf/nihms787733.pdf>
 23. Ansari J, Yun JW, Kompelli AR, Moufarrej YE, Alexander JS, Herrera GA, et al. The liquid biopsy in lung cancer. *Genes Cancer* [Internet]. 2016;7(11–12):355–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28191282%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5302037>
 24. Liu X, Lu Y, Zhu G, Lei Y, Zheng L, Qin H, et al. The diagnostic accuracy of pleural effusion and plasma samples versus tumour tissue for detection of EGFR mutation in patients with advanced non-small cell lung cancer: comparison of methodologies. *J Clin Pathol*. 2013;66(12):1065–9.
 25. Kim ST, Jung H-Y, Sung JS, Jo UH, Tanaka T, Hagiwara K, et al. Can serum be used for analyzing the EGFR mutation status in patients with advanced non-small cell lung cancer? *Am J Clin Oncol*. 2013;36(1):57–63.
 26. Marchetti A, Del Grammastio M, Felicioni L, Malatesta S, Filice G, Centi I, et al. Assessment of EGFR mutations in circulating tumor cell preparations from NSCLC patients by next generation sequencing: Toward a real-time liquid biopsy for treatment. *PLoS One*. 2014;9(8).
 27. Que D, Xiao H, Zhao B, Zhang X, Wang Q, Xiao H, et al. EGFR mutation status in plasma and tumor tissues in non-small cell lung cancer serves as a predictor of response to EGFR-TKI treatment. *Cancer Biol Ther*. Taylor & Francis; 2016;17(3):320–7.
 28. Bai H, Mao L, Wang HS, Zhao J, Yang L, An TT, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA samples predict tumor response in Chinese patients with stages IIIB to IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(16):2653–9.
 29. Yin C, Luo C, Hu W, Ding X, Yuan C, Wang F. Quantitative and Qualitative Analysis of Circulating Cell-Free DNA Can Be Used as an Adjuvant Tool for Prostate Cancer Screening: A Meta-Analysis. *Dis Markers*. 2016;2016.
 30. Douillard J-Y, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, Cole R, McWalter G, et al. Gefitinib Treatment in EGFR Mutated Caucasian NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2014;9(9):1345–53.
 31. He C, Liu M, Zhou C, Zhang J, Ouyang M, Zhong N, et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by mutant-enriched PCR assay for prediction of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2009;125(10):2393–9.
 32. He J, Tan W, Ma J. Circulating tumor cells and DNA for real-time EGFR detection and monitoring of non-small-cell lung cancer. 2017;
 33. Jiang B, Liu F, Yang L, Zhang W, Yuan H, Wang J, et al. Serum detection of epidermal growth factor receptor gene mutations using mutant-enriched sequencing in Chinese patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Int Med Res*. 2011;39(4):1392–401.
 34. Kim H-R, Lee SY, Hyun D-S, Lee MK, Lee H-K, Choi C-M, et al. Detection of EGFR mutations in circulating free DNA by PNA-mediated PCR clamping. *J Exp Clin Cancer Res. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*; 2013;32(1):50.
 35. Kuang Y, Rogers A, Yeap BY, Wang L, Makrigiorgos M, Vetrand K, et al. Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(8):2630–6.
 36. Yang Y, Shen X, Li R, Shen J, Zhang H, Yu L, et al. The detection and significance of EGFR and BRAF in cell-free DNA of peripheral blood in NSCLC. *Oncotarget*. 2017; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28572536%5Cnhttp://www.oncotarget.com/fulltext/17937>
 37. Zhao X, Han RB, Zhao J, Wang J, Yang F, Zhong W, et al. Comparison of epidermal growth factor receptor mutation statuses in tissue and plasma in stage I-IV non-small cell lung cancer patients. *Respiration*. 2013;85(2):119–25.
 38. Zhu G, Ye X, Dong Z, Lu YC, Sun Y, Liu Y, et al. Highly sensitive droplet digital PCR method for detection of EGFR-activating mutations in plasma cell-free DNA from patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Mol Diagnostics*. 2015;17(3):265–72.
 39. Kwapisz D. The first liquid biopsy test approved. Is it a new era of mutation testing for non-small cell lung cancer? *Ann Transl Med*. 2017;5(3):1–7.
 40. Chabon JJ, Simmons AD, Lovejoy AF, Esfahani MS, Newman AM, Haringsma HJ, et al. Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of EGFR inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients. *Nat Commun. Nature Publishing Group*; 2016;7(May):11815.
 41. Schumacher TN, Scheper W. A liquid biopsy for cancer immunotherapy. *Nat Med. Nature Publishing Group*; 2016;22(4):340–1.
 42. Alix-Panabieres C, Bartkowiak K, Pantel K. Functional studies on circulating and disseminated tumor cells in carcinoma patients. *Mol Oncol*. 2016;10(3):443–9.
 43. Han Y, Li J. Sample types applied for molecular diagnosis of therapeutic management of advanced non-small cell lung cancer in the precision medicine. *Clin Chem Lab Med*. 2017;0(0). Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/cclm.ahead-of-print/cclm-2017-0112/cclm-2017-0112.xml>
 44. Douillard J-Y, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, McCormack R, Webster A, et al. First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *Br J Cancer. Nature Publishing Group*; 2014;110(1):55–62.
 45. Kim ST, Sung JS, Jo UH, Park KH, Shin SW, Kim YH. Can mutations of EGFR and KRAS in serum be predictive and prognostic markers in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC)? *Med Oncol*. 2013;30(1):328.