

2020-2021

Thèse de Médecine  
DES de pneumologie

# **Evaluation technique de l'analyse NGS (Next Generation Sequencing) du liquide pleural chez 28 patients atteints d'un carcinome bronchique non à petites cellules, et de sa place dans la stratégie thérapeutique.**

**Marx Marie Sirima**

Née le 17 juin 1988 à Strasbourg (67)

Sous la direction de M. Gonzague de Chabot

Membres du jury

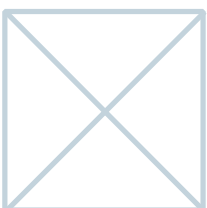
Pr Thierry Urban | Président

Dr Gonzague De Chabot | Directeur

Pr Marie Briet | Membre

Pr Philippe Guardiola | Membre

Pr Wojciech Trzepizur | Membre



Soutenu (publiquement) le :  
Mardi 28 avril 2020



**L'auteur du présent document  
vous  
autorise à le partager,  
reproduire,  
distribuer et communiquer selon  
les conditions suivantes :**



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



# LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE SANTÉ D'ANGERS

---

**Doyen de la Faculté** : Pr Nicolas Lerolle

**Vice-Doyen de la Faculté et directeur du département de pharmacie** : Pr  
Frédéric Lagarce

**Directeur du département de médecine** : Pr Cédric Annweiler

## PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

ABRAHAM Pierre	Physiologie	Médecine
ANNWEILER Cédric	Gériatrie et biologie du vieillissement	Médecine
ASFAR Pierre	Réanimation	Médecine
AUBE Christophe	Radiologie et imagerie médicale	Médecine
AUGUSTO Jean-François	Néphrologie	Médecine
AZZOUZI Abdel Rahmène	Urologie	Médecine
BAUFRETON Christophe	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire	Médecine
BENOIT Jean-Pierre	Pharmacotechnie	Pharmacie
BEYDON Laurent	Anesthésiologie-réanimation	Médecine
BIGOT Pierre	Urologie	Médecine
BONNEAU Dominique	Génétique	Médecine
BOUCHARA Jean-Philippe	Parasitologie et mycologie	Médecine
BOUVARD Béatrice	Rhumatologie	Médecine
BOURSIER Jérôme	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
BRIET Marie	Pharmacologie	Médecine
CAILLIEZ Eric	Médecine générale	Médecine
CALES Paul	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
CAMPONE Mario	Cancérologie ; radiothérapie	Médecine
CAROLI-BOSC François-xavier	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
CHAPPARD Daniel	Cytologie, embryologie et cytogénétique	Médecine
CONNAN Laurent	Médecine générale	Médecine
COUTANT Régis	Pédiatrie	Médecine
CUSTAUD Marc-Antoine	Physiologie	Médecine
DE CASABIANCA Catherine	Médecine Générale	Médecine
DESCAMPS Philippe	Gynécologie-obstétrique	Médecine
D'ESCATHA Alexis	Médecine et santé au Travail	Médecine
DINOMAS Mickaël	Médecine physique et de réadaptation	Médecine
DIQUET Bertrand	Pharmacologie	Médecine
DUBEE Vincent	Maladies Infectieuses et Tropicales	Médecine
DUCANCELLE Alexandra	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
DUVAL Olivier	Chimie thérapeutique	Pharmacie

DUVERGER Philippe	Pédopsychiatrie	Médecine
EVEILLARD Mathieu	Bactériologie-virologie	Pharmacie
FAURE Sébastien	Pharmacologie physiologie	Pharmacie
FOURNIER Henri-Dominique	Anatomie	Médecine
FURBER Alain	Cardiologie	Médecine
GAGNADOUX Frédéric	Pneumologie	Médecine
GARNIER François	Médecine générale	Médecine
GASCOIN Géraldine	Pédiatrie	Médecine
GOHIER Bénédicte	Psychiatrie d'adultes	Médecine
GUARDIOLA Philippe	Hématologie ; transfusion	Médecine
GUILET David	Chimie analytique	Pharmacie
HAMY Antoine	Chirurgie générale	Médecine
HENNI Samir	Chirurgie Vasculaire, médecine vasculaire	Médecine
HUNAUT-BERGER Mathilde	Hématologie ; transfusion	Médecine
IFRAH Norbert	Hématologie ; transfusion	Médecine
JEANNIN Pascale	Immunologie	Médecine
KEMPF Marie	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
LACCOURREYE Laurent	Oto-rhino-laryngologie	Médecine
LAGARCE Frédéric	Biopharmacie	Pharmacie
LARCHER Gérald	Biochimie et biologie moléculaires	Pharmacie
LASOCKI Sigismond	Anesthésiologie-réanimation	Médecine
LEGENDRE Guillaume	Gynécologie-obstétrique	Médecine
LEGRAND Erick	Rhumatologie	Médecine
LERMITE Emilie	Chirurgie générale	Médecine
LEROLLE Nicolas	Médecine Intensive-Réanimation	Médecine
LUNEL-FABIANI Françoise	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
MARCHAIS Véronique	Bactériologie-virologie	Pharmacie
MARTIN Ludovic	Dermato-vénéréologie	Médecine
MAY-PANLOUP Pascale	Biologie et médecine du développement et De la reproduction	Médecine
MENEI Philippe	Neurochirurgie	Médecine
MERCAT Alain	Réanimation	Médecine
MERCIER Philippe	Anatomie	Médecine
PAPON Nicolas	Parasitologie et mycologie médicale	Pharmacie
PASSIRANI Catherine	Chimie générale	Pharmacie
PELLIER Isabelle	Pédiatrie	Médecine
PETIT Audrey	Médecine et Santé au Travail	Médecine
PICQUET Jean	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire	Médecine
PODEVIN Guillaume	Chirurgie infantile	Médecine
PROCACCIO Vincent	Génétique	Médecine
PRUNIER Delphine	Biochimie et Biologie Moléculaire	Médecine
PRUNIER Fabrice	Cardiologie	Médecine

REYNIER Pascal	Biochimie et biologie moléculaire	Médecine
RICHARD Isabelle	Médecine physique et de réadaptation	Médecine
RICHOMME Pascal	Pharmacognosie	Pharmacie
RODIEN Patrice	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques	Médecine
ROQUELAURE Yves	Médecine et santé au travail	Médecine
ROUGE-MAILLART Clotilde	Médecine légale et droit de la santé	Médecine
ROUSSEAU Audrey	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
ROUSSEAU Pascal	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique	Médecine
ROUSSELET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
ROY Pierre-Marie	Thérapeutique	Médecine
SAULNIER Patrick	Biophysique et biostatistique	Pharmacie
SERAPHIN Denis	Chimie organique	Pharmacie
TRZEPIZUR Wojciech	Pneumologie	Médecine
UGO Valérie	Hématologie ; transfusion	Médecine
URBAN Thierry	Pneumologie	Médecine
VAN BOGAERT Patrick	Pédiatrie	Médecine
VENIER-JULIENNE Marie-Claire	Pharmacotechnie	Pharmacie
VERNY Christophe	Neurologie	Médecine
WILLOTEAUX Serge	Radiologie et imagerie médicale	Médecine

#### MAÎTRES DE CONFÉRENCES

ANGOULVANT Cécile	Médecine Générale	Médecine
BAGLIN Isabelle	Chimie thérapeutique	Pharmacie
BASTIAT Guillaume	Biophysique et biostatistique	Pharmacie
BEAUVILLAIN Céline	Immunologie	Médecine
BELIZNA Cristina	Médecine interne	Médecine
BELLANGER William	Médecine générale	Médecine
BELONCLE François	Réanimation	Médecine
BENOIT Jacqueline	Pharmacologie	Pharmacie
BIERE Loïc	Cardiologie	Médecine
BLANCHET Odile	Hématologie ; transfusion	Médecine
BOISARD Séverine	Chimie analytique	Pharmacie
CAPITAIN Olivier	Cancérologie ; radiothérapie	Médecine
CASSEREAU Julien	Neurologie	Médecine
CHAO DE LA BARCA	Juan-Manuel	Médecine
CHEVALIER Sylvie	Biologie cellulaire	Médecine

CLERE Nicolas	Pharmacologie / physiologie	Pharmacie
COLIN Estelle	Génétique	Médecine
DERBRE Séverine	Pharmacognosie	Pharmacie
DESHAYES Caroline	Bactériologie virologie	Pharmacie
FERRE Marc	Biologie moléculaire	Médecine
FORTRAT Jacques-Olivier	Physiologie	Médecine
HAMEL Jean-François	Biostatistiques, informatique médicale	Médicale
HELESBEUX Jean-Jacques	Chimie organique	Pharmacie
HINDRE François	Biophysique	Médecine
KHIATI Salim	Biochimie et biologie moléculaire	Médecine
JOUSSET-THULLIER Nathalie	Médecine légale et droit de la santé	Médecine
JUDALET-ILLAND Ghislaine	Médecine Générale	Médecine
KUN-DARBOIS Daniel	Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie	Médecine
LACOEUILLE Franck	Biophysique et médecine nucléaire	Médecine
LEBDAI Souhil	Urologie	Médecine
LANDREAU Anne	Botanique/ Mycologie	Pharmacie
LEBDAI Souhil	Urologie	Médecine
LEGEAY Samuel	Pharmacocinétique	Pharmacie
LE RAY-RICHOMME Anne-Marie	Pharmacognosie	Pharmacie
LEPELTIER Elise	Chimie générale	Pharmacie
LETOURNEL Franck	Biologie cellulaire	Médecine
LIBOUBAN Hélène	Histologie	Médecine
LUQUE PAZ Damien	Hématologie; Transfusion	Médecine
MABILLEAU Guillaume	Histologie, embryologie et cytogénétique	Médecine
MALLET Sabine	Chimie Analytique	Pharmacie
MAROT Agnès	Parasitologie et mycologie médicale	Pharmacie
MESLIER Nicole	Physiologie	Médecine
MOUILLIE Jean-Marc	Philosophie	Médecine
NAIL BILLAUD Sandrine	Immunologie	Pharmacie
PAILHORIES Hélène	Bactériologie-virologie	Médecine
PAPON Xavier	Anatomie	Médecine
PASCO-PAPON Anne	Radiologie et imagerie médicale	Médecine
PECH Brigitte	Pharmacotechnie	Pharmacie
PENCHAUD Anne-Laurence	Sociologie	Médecine
PIHET Marc	Parasitologie et mycologie	Médecine
PY Thibaut	Médecine Générale	Médecine
RAMOND-ROQUIN Aline	Médecine Générale	Médecine
RINEAU Emmanuel	Anesthésiologie réanimation	Médecine
RIOU Jérémie	Biostatistiques	Pharmacie
ROGER Emilie	Pharmacotechnie	Pharmacie
SAVARY Camille	Pharmacologie-Toxicologie	Pharmacie
SCHMITT Françoise	Chirurgie infantile	Médecine
SCHINKOWITZ Andréas	Pharmacognosie	Pharmacie
SPIESSER-ROBELET Laurence	Pharmacie Clinique et Education Thérapeutique	Pharmacie

TANGUY-SCHMIDT Aline	Hématologie ; transfusion	Médecine
TESSIER-CAZENEUVE Christine	Médecine Générale	Médecine
VENARA Aurélien	Chirurgie générale	Médecine
VIAULT Guillaume	Chimie organique	Pharmacie

#### PROFESSEURS EMERITES

Philippe MERCIER	Neurochirurgie	Médecine
Dominique CHABASSE	Parasitologie et Médecine Tropicale	Médecine
Jean-François SUBRA	Néphrologie	Médecine

#### AUTRES ENSEIGNANTS

AUTRET Erwan	Anglais	Médecine
BARBEROUSSE Michel	Informatique	Médecine
BRUNOIS-DEBU Isabelle	Anglais	Pharmacie
CHIKH Yamina	Économie-Gestion	Médecine
FISBACH Martine	Anglais	Médecine
O'SULLIVAN Kayleigh	Anglais	Médecine

Mise à jour au 09/12/2019

## Remerciements

Mes pensées vont à toutes les personnes qui ont contribué à l'élaboration de ce travail,

Je tiens en premier lieu à adresser mes plus sincères remerciements au Dr de Chabot qui a accepté de diriger ma Thèse, pour son aide précieuse dans l'élaboration et la rédaction de ce travail, pour sa bienveillance ses encouragements essentiels dans les moments de doute.

Je remercie le Professeur Guardiola et le Professeur Briet pour leur aide, du choix du sujet à l'interprétation des résultats, j'ai beaucoup appris grâce à nos discussions. Un grand merci à Simon Souchet pour la base de données, et à Diane Lambert pour toute la partie technique de laboratoire.

Plus généralement, je souhaite adresser un immense merci au professeur Urban pour sa patience et sa disponibilité tout au long de mon cursus, et pour son aide pour les travaux universitaires.

Merci à tout le personnel du service de pneumologie du CHU d'Angers qui m'entoure depuis presque 5 ans, médecins, infirmières, AS, ASH, brancardiers, kinés (Herveline merci pour ta bonne humeur quotidienne !).

Une pensée particulière pour le Docteur Hureaux, toujours pédagogue et disponible, le Docteur Jeanfaivre pour ses conseils pertinents, les Docteurs Pinquié et Justeau pour leur gentillesse, et les médecins de l'unité 330 tous bienveillants, qui m'ont apporté des connaissances et un intérêt vif pour tous les sujets qui font la richesse de la Pneumologie !

Un très grand merci à toute l'équipe du service de pneumologie du CH de Cholet, notamment au Dr Masson. Ce fût un semestre révélateur concernant mon attrait pour l'oncologie thoracique, et pour la pneumologie en général.

Merci aux secrétaires des services côtoyés lors de mon cursus : Pneumologie à Angers et à Cholet, Oncologie médicale et Radiothérapie à l'Institut de Cancérologie de l'Ouest.

Une pensée chaleureuse et nostalgique pour l'équipe médicale et paramédicale du service de radiothérapie de l'ICO qui a fait preuve d'une gentillesse immense envers la future maman que j'étais.

A mes collègues, co-internes adorables, Timothée, Marion, Antonin (merci pour le coup de main de déménagement), Rose, Pauline, etc

A mon tout petit Edgar, doux comme un soleil de printemps

A toi Louis-Maxime, au sourire incroyable, et qui m'apporte un soutien inconditionnel ; la vie est douce à tes côtés !

John, Bro ! Maman, MERCI pour votre confiance, ne laissez personne vous faire douter, vous êtes inestimables.

A toute ma famille et ma belle-famille, merci pour les encouragements, vous êtes adorables !





# **Sommaire**

**INTRODUCTION**

**MATERIEL ET METHODES**

**RESULTATS**

**DISCUSSION**

**CONCLUSION**

**BIBLIOGRAPHIE**

**TABLEAUX**

**FIGURES**

**ANNEXES**

## Liste des abréviations

ADN = Acide Desoxyribonucléique

ALK= Anaplastic Lymphoma Kinase

ATP= Adenosin-Triphosphate

BRAF = v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B

CHU= Centre Hospitalier Universitaire

CTNNB1= Catenin Beta 1

EDTA= ethylenediamintetraacetic

EGFR= Epidermal Growth Receptor

FGFR3= Fibroblast Growth Factor Receptor 3

IDH1-1= Isocitrate déshydrogénase

ISP= Ion Sphere™ Particles

JAK2= Janus kinase 2

JAK3= Janus kinase 3

KRas= V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LC= Lung and Colon

MET= HGF (Hepatocyte Growth Factor)

NGS = Next Generation Sequencing

NRas=Neuroblastoma Ras Gene

PCR = polymerase chain reaction

PDL(-1) = Programmed-death ligand (1)

PIK3CA= Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-3-kinase catalytic subunit alpha

ROS1 = c-ROS oncogene 1

T790M=Thr790Met

TKI=tyrosine kinase inhibitor

TP53= Tumor protein 53

# Introduction

## Epidémiologie

Le cancer broncho-pulmonaire est le second cancer le plus fréquent dans le monde avec une estimation à 228 150 nouveaux cas pour 2019. C'est le premier cancer en terme de mortalité, responsable d'un quart des décès par cancer soit 142 670 décès estimés en 2019 dans le monde (1). 85% sont des cancers bronchiques non à petites cellules (2) et 40 à 55% de ceux-ci sont diagnostiqués au stade métastatique, avec une survie relative à 5 ans à 3,8% (1)

## Drivers oncogéniques

L'identification dans le tissu tumoral de mutations génétiques responsables d'addiction oncogénique, et le développement de traitements ciblant ces altérations, ont permis depuis une dizaine d'années de révolutionner le pronostic des patients concernés (3) et de leur offrir de meilleurs profils de tolérance. Ces thérapies ciblées, utilisées notamment dans les mélanomes, les cancers du sein ou du rein, constituent désormais la clé de voûte de la médecine personnalisée en oncologie.

## Récepteur de l'Epidermal Growth Factor

La principale altération recherchée en cancérologie thoracique est une mutation du récepteur de l'Epidermal Growth Factor (EGFR) qui concerne 12 à 16% des patients (4) (5) ainsi que la principale mutation de résistance aux premières générations de thérapies ciblées, nommée T790M.

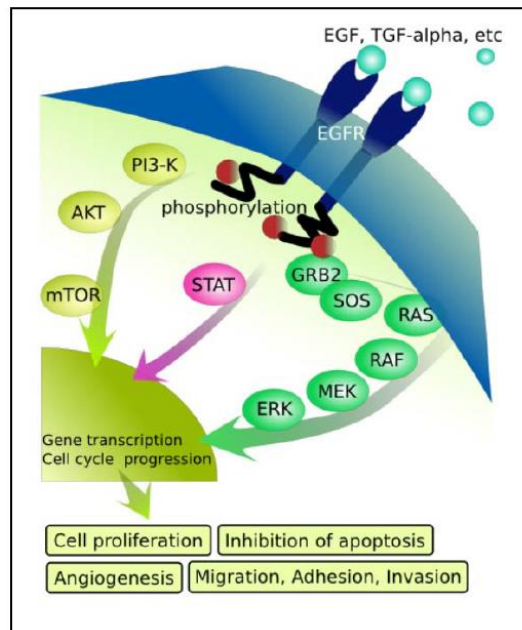


Figure 1 voies de signalisation de l'EGFR(5)

Le récepteur de l'EGFR est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs à tyrosine kinases qui jouent un rôle central dans la transduction du signal cellulaire. La fixation de son ligand entraîne dans la cellule normale une cascade d'évènements intracellulaires aboutissant à la croissance, à la prolifération et au contrôle de la mort cellulaire. La surexpression d'EGFR est présente dans environ 60 % des carcinomes épidermoïdes et 40 % des adénocarcinomes, mais cette simple surexpression ne constitue pas une cible thérapeutique (6). Les mutations de l'exon 19 ou 21 entraînent une dimérisation spontanée de ce récepteur, activant la voie de signalisation sous-jacente sans nécessité de fixation au ligand, ce qui entraîne une prolifération cellulaire incontrôlée. C'est ce mécanisme qui est ciblé par les inhibiteurs de tyrosine kinase.

### Inhibiteurs de tyrosine kinase

Les Tyrosine Kinase Inhibitors (TKI) sont des inhibiteurs ATP-compétitifs spécifiques d'une ou plusieurs kinases. Certaines mutations de l'EGFR confèrent une sensibilité particulière aux tyrosine kinase inhibiteurs (TKI) (7,8) avec un pronostic et un profil de tolérance meilleurs que ceux de la chimiothérapie(8). L'erlotinib, le gefitinib, et l'afatinib ont été validés en première ligne pour ces patients (8) (9) (10), avec une médiane de survie sans progression de 11,0 mois (versus 5,6 mois sous chimiothérapie) (11) suivis de l'osimertinib, TKI de 3ème génération avec une médiane de survie sans progression en première ligne de 22,1 mois (12,13).

Environ 60% des patients progressent sous TKI de première et deuxième génération du fait de l'émergence de la mutation T790M dont l'incidence est d'environ 70% en association avec d'autres mutations (14). La rebiopsie systématique à la progression fait partie des recommandations internationales pour rechercher notamment la mutation T790M (15). L'osimertinib permet de contourner la résistance liée à cette mutation.

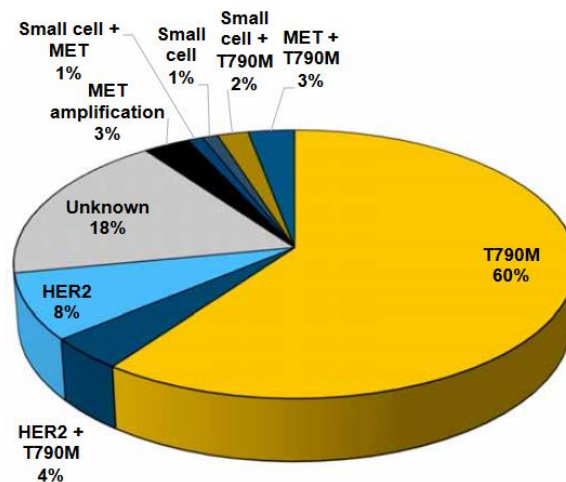


Figure 2 Yu et al. Clin Cancer Res. 2013;19:2240-47

## Epanchement pleural

L'apparition d'un épanchement pleural est un événement fréquent au cours de l'histoire naturelle du cancer broncho pulmonaire : 40% des patients présentent un épanchement pleural au diagnostic ou au cours de l'évolution de la maladie (16). Concernant une série de 840 patients présentant un épanchement pleural malin, la cause de l'épanchement était un cancer broncho-pulmonaire dans 37% des cas (17). Celui-ci peut être symptomatique ou mis en évidence à la faveur d'une imagerie de réévaluation. Il est plus fréquemment retrouvé dans le sous-type adénocarcinome, est associé à un pronostic plus sombre (18).

Le prélèvement de liquide par ponction pleurale est un geste simple, peu invasif, pouvant être réalisé de manière itérative si nécessaire, et qui permet de définir l'extension de la maladie pulmonaire à la plèvre.

## Séquençage de Nouvelle Génération

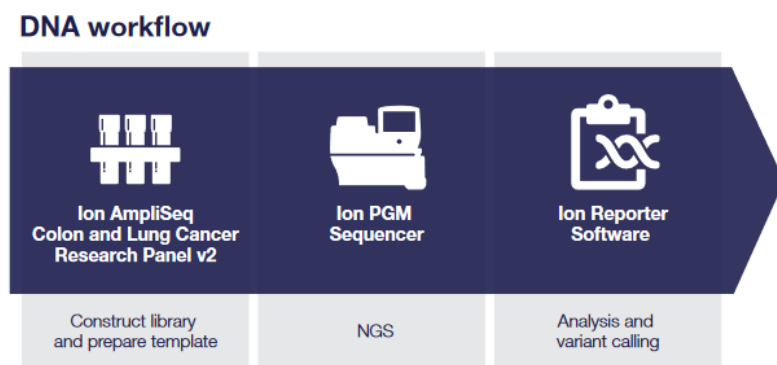


Figure 3 : NGS Ion Torrent workflow for DNA analysis (19)

La technique NGS (Next Generation Sequencing, ou séquençage à haut débit) est une technique de séquençage de l'ADN qui a un rôle central dans la détection des mutations d'intérêt thérapeutique en cancérologie (20). L'ADN extrait, purifié, amplifié, identifié, est fixé sur une puce, puis séquencé via une méthode utilisant le pH. Cette technique est actuellement validée pour analyser le tissu tumoral et le plasma, mais il existe peu de données dans la littérature concernant son utilisation pour le liquide pleural. Il semble qu'elle pourrait constituer une technique fiable, sensible, et accessible, complémentaire au prélèvement tissulaire tumoral, ou alternative lorsque celui-ci ne peut pas être réalisé (état respiratoire ou général ne permettant pas la réalisation de biopsies tumorales, localisation tumorale inadéquate, geste à risque, refus du patient) (21)(22).

### Etude

Pour cette étude monocentrique rétrospective, nous avons recueilli les données cliniques et paracliniques concernant 28 patients suivis entre 2013 et 2020 dans le Service de Pneumologie du CHU d'Angers pour un cancer broncho-pulmonaire, qui ont présenté au cours de leur maladie une pleurésie ayant pu être prélevée et analysée en NGS.

Le premier objectif de ce travail consistait à évaluer la technique du NGS réalisée sur le liquide pleural en comparant les performances de deux kits différents utilisés en routine dans le laboratoire du CHU d'Angers (HotSpot Cancer Panel v2, et Lung and Colon) dans la détection de mutations de l'EGFR en comparant les résultats obtenus entre le culot et le surnageant après centrifugation du liquide pleural, et en comparant enfin les résultats obtenus entre le liquide pleural et le plasma.

Le second objectif était d'évaluer l'impact sur la décision thérapeutique de ces résultats, et notamment l'accès à une thérapie ciblée afin de préciser la place de cette analyse en pratique clinique chez les patients atteints d'un cancer-broncho pulmonaire non à petites cellules.

## Matériel et Méthodes

### Ethique

Ce travail a été approuvé par le comité d'éthique du CHU d'Angers, et par la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés.

### Population étudiée

28 patients ont été inclus dans cette étude. Il s'agissait de patients atteints d'un carcinome broncho-pulmonaire non à petites cellules, ayant eu au moins une analyse du liquide pleural par NGS entre janvier 2017 et janvier 2020. Pour chaque patient ont été analysés au moins un liquide pleural, et pour certains du tissu tumoral ou du plasma, ou les deux.

### Prélèvements et extraction d'ADN

#### 1. Prélèvements tumoraux FFPE (formaldehyde-fixed and paraffin-embedded)

Des coupes de tissu tumoral ont été colorées à l'hématoxyline et à l'éosine puis fixées au formaldéhyde et incluse en paraffine. La zone tumorale a été examinée et encadrée par un anatomopathologiste. Des coupes de tissu non coloré d'une épaisseur de 10µM ont été micro disséquées manuellement au niveau de la zone tumorale en utilisant la lame colorée comme guide puis déparaffinées. L'extraction et la purification d'ADN ont été effectuées en utilisant le kit NucleoSpin® DNA FFPE XS (Macherey-Nagel, Duren, Allemagne) selon les instructions du fabricant. A la fin de l'extraction, l'échantillon a été incubé pendant 5min à 90°C pour éliminer toute trace d'éthanol résiduel. L'ADN double brin a été quantifié avec le kit Qubit dsDNA HS assay à l'aide d'un fluorimètre Qubit® 2.0 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) selon les recommandations du fabricant, puis conservé à -20 ° C.



## 2. Prélèvements plasmatiques et liquide pleural

Le plasma a été récupéré à partir de sang prélevé dans des tubes EDTA. Le sang a été centrifugé une première fois à 1700g pendant 10min à température ambiante, le plasma ainsi isolé a été centrifugé à nouveau à 1800g pendant 15min à température ambiante. Il a ensuite été aliquoté et conservé à -80°C.

Le liquide pleural a été prélevé dans des tubes secs avant de subir deux centrifugations consécutives à température ambiante, une à 1700g pendant 10min et une à 1800g pendant 15min. Il a ensuite été aliquoté et conservé à -80°C.

L'ADN circulant a été extrait du plasma et du liquide pleural grâce au kit NucleoSpin® Plasma XS (Macherey-Nagel, Duren, Allemagne) selon les instructions du fabricant. A la fin de chaque extraction les échantillons ont été incubés pendant 17min à 75°C pour éliminer toute trace d'éthanol résiduel. L'ADN double brin a été quantifié avec le kit Qubit dsDNA HS assay à l'aide d'un fluorimètre Qubit® 2.0 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) et congelé à -20 ° C.

## 3. Culots cellulaires et fragment tissulaire

Les culots cellulaires ont été obtenus après la double centrifugation du liquide pleural et congelés à -80°C.

Pour un patient, un fragment tissulaire a été récupéré à partir du liquide pleural, congelé rapidement dans l'azote liquide et conservé à -80°C.

L'ADN génomique a été isolé à partir des culots cellulaires et du fragment tissulaire grâce au kit d'extraction NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Duren, Allemagne), avec une première étape manuelle pour le fragment tissulaire qui a été broyé dans du tampon de lyse T1 à l'aide d'un potter en présence d'azote liquide avant d'être incubé 3h à 56°C avec de la protéinase K. L'ADN double brin a été quantifié avec le kit Qubit dsDNA HS assay à l'aide d'un fluorimètre Qubit® 2.0 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) et congelé à -20 ° C.

## Préparation de la librairie ou préparation de l'ADN pour le séquençage

La préparation de la librairie a été effectuée en utilisant le kit Ion Ampliseq™ Library kit 2.0 associé soit au kit d'amorces Ion Ampliseq™ Cancer Hotspot Panel v2 soit au kit Ion Ampliseq™ Colon and Lung Cancer Panel (ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Waltham, USA) en suivant les instructions du fabricant. Le panel Cancer Hotspot a été conçu pour cibler les régions hotspot de 50 oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs en utilisant 207 paires d'amorces dans un seul tube. Le kit Lung and Colon, cible les régions hotspots de 22 gènes connus pour être associés aux cancers du poumon et du colon grâce à 90 paires d'amorces rassemblées en un seul tube.

Pour chaque condition, 10ng d'ADN double brin ou 6µl d'ADN circulant ont été amplifiés au niveau des régions hotspot et marqués individuellement avec des adaptateurs et des barres codes contenus dans le kit Ion Xpress Barcode Adapters 1-16 Kit (ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Waltham, USA). Après purification à l'aide de billes magnétiques AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA), la quantité et la qualité de la librairie ont été évaluées au bioanalyseur Agilent 2100 grâce au kit Agilent High-Sensitivity DNA (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

## PCR en émulsion

Après quantification, chaque librairie a été diluée à 13pM et regroupée par 6 échantillons différents pour les tumeurs ou par 4 pour les librairies provenant d'ADN circulant. Grâce à l'Ion One Touch 2 System (ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Waltham, USA), chaque amplicon a été amplifié de façon clonale sur les Ion Sphere™ Particles (ISP) par PCR en émulsion en utilisant le kit Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 - 200 (ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Waltham, USA) selon le protocole du fabricant. Les ISP contenant des matrices d'ADN ont été enrichies, par la suite, grâce aux billes Dynabeads® MyOne™ Steptavidine C1 sur un Ion OneTouch™ ES (ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Waltham, USA) suivant les recommandations du fabricant.

## Séquençage

Les ISP, ainsi obtenues, ont été déposées sur une puce Ion 318<sup>™</sup> v2 et l'ADN séquençé par le séquenceur Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) à l'aide du kit de séquençage Ion PGM<sup>™</sup> Hi-Q<sup>™</sup> View (ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Waltham, USA) en suivant les instructions du fabricant.

## Analyses des données

L'alignement a été fait avec l'outil Torrent Server en prenant l'annotation du génome hg19, et l'annotation des variants a été faite avec l'outil Variant Caller v5.0-13.

Le test des rangs signés de Wilcoxon a été utilisé pour comparer les fréquences alléliques obtenues avec les deux kits de détection des mutations et dans les différents échantillons biologiques. Une valeur de  $p < 0,05$  était considérée comme significative.

La qualité des kits est un score composite incluant notamment la profondeur de séquençage.

# Résultats

## Données cliniques et paracliniques

### 1. Caractéristiques de la population étudiée

28 patients ont été inclus dans cette étude. Il s'agissait de patients atteints d'un carcinome broncho-pulmonaire non à petites cellules, ayant eu au moins une analyse du liquide pleural par la technique NGS entre janvier 2017 et janvier 2020.

La moitié étaient des hommes (n=14), 15 patients (53,5%) étaient fumeurs, et 2 (7%) patients avaient été exposés à de l'amiante.

L'âge médian au diagnostic était de 74 ans, avec un score OMS à 1 pour la moitié des patients (n=14), à 2 pour un tiers des patients (n= 9), à 0 pour 7% (n=2), et à 4 pour 1 patient (3,5%) (**Tableau 1**).

85,7% (n=24) des échantillons concernaient des adénocarcinomes, il n'y avait aucun carcinome épidermoïde. Le pourcentage restant correspond à des carcinomes bronchiques non à petites cellules d'autres types.

Parmi les 11 patients présentant une mutation de l'EGFR, 3 patients ont eu à la fois une analyse de la tumeur, du plasma et du liquide pleural. 3 autres patients ont eu une analyse du liquide pleural uniquement, 3 autres ont eu une analyse du liquide pleural et du plasma, et enfin 2 patients ont eu une analyse du liquide pleural et de la tumeur.

Le statut PDL-1 était inférieur à 1% dans un quart des cas (n= 7), compris entre 1 et 50% pour 4 patients (14%) et supérieur à 50% pour 4 patients (14%), mais il n'était pas recherché ou non retrouvé dans le dossier pour près de la moitié des patients (46%).

### 2. Circonstances du diagnostic

82% des patients (n=23) étaient diagnostiqués au stade multi-métastatique d'emblée (**Tableau 2**). 78,5% des patients (n=22) n'avaient pas de métastases cérébrales au diagnostic.

Le diagnostic initial était principalement fait sur le liquide pleural (50%) ou sur un prélèvement de lésion pulmonaire (42,8%). Pour ce dernier, c'est la fibroscopie bronchique qui permettait de poser le diagnostic dans 9 cas (32%), et la ponction transcutanée guidée par le scanner dans 2 cas (7%).

### 3. Caractéristiques de l'épanchement pleural

Concernant l'épanchement pleural, il était présent au diagnostic chez 85,7% (n= 24) des patients, unilatéral dans 75% des cas (n= 21), et principalement de moyenne à grande abondance (respectivement 42,8% (n= 12) et 50% (n= 14)). Dans 14% (n=4) des cas il était mis en évidence lors d'une progression tumorale. Il s'agissait d'exsudats dans 60,7% des cas (n= 17) et de transsudats dans 7 cas (25%) (14% non documentés, analyse non faite ou non disponible).

Des cellules néoplasiques ont été mises en évidence dans le liquide pleural pour 89% des patients (n= 25). (**Tableau 3**)

### 4. Caractéristiques moléculaires

Sur les 28 patients dont les échantillons ont été analysés, 11 (39%) avaient une mutation de l'EGFR (dont 54,5% (n=6) chez des fumeurs), et 11 (39%) avaient une mutation de TP53. 6 (21%) avaient une mutation de KRas, 2 (5%) une translocation ALK, une mutation de BRAF ou de PIK3CA, et 1 (3,5%) une mutation de MET, NRas, FGFR3, JAK3, JAK2, CTNNB1, IDH1 1. Nous avons détecté une altération unique chez 10 patients (35,7%), 2 altérations chez 9 patients (32%), 3 altérations chez 4 patients (14%). 5 altérations ont été mises en évidences chez un patient (3,5%).

**Au total une mutation de l'EGFR a été mise en évidence dans le liquide pleural chez 9 patients sur les 11 porteurs de cette mutation, soit 81%.**

**Chez 7 patients (25% du total de l'effectif, 63,6% des patients mutés EGFR), la mutation n'était retrouvée que dans le plasma et/ou dans le liquide pleural. La mutation n'était pas détectée dans le tissu tumoral, ou il n'y avait pas d'échantillon tumoral, ou la technique n'avait pas permis de conclure.**

**Chez 5 patients (17,8% du total, 45% des mutés EGFR) la mutation EGFR n'a été retrouvée que dans le liquide pleural (absence de mutation détectée dans le plasma et dans la tumeur, échec technique, ou absence de prélèvement), et a permis de guider la thérapeutique de première ligne.**

## 5. Traitements

La majorité des patients ont reçu au total une seule ligne de traitement (n=13 soit 46%), ou aucun traitement anti-néoplasique (n=9 soit 32%). 10 patients (35,7%) ont été traités par un inhibiteur de tyrosine kinase (TKI).

78,5% des patients (n=22), n'avaient pas reçu de traitement avant la réalisation du prélèvement pleural ce qui s'explique par le fait que 85,7% des épanchements étaient présents dès le diagnostic, donc analysés avant toute ligne de traitement.

Suite au prélèvement pleural, la majorité des patients n'a reçu qu'une ligne de traitement (60,7%, n=17) ou aucun traitement (32%, n=9).

Concernant les traitements complémentaires, le plus fréquent était la radiothérapie conformationnelle ou stéréotaxique sur une lésion secondaire (21%).

## Données moléculaires

### 1. Comparaison entre le kit Lung and Colon (LC) et le kit Hotspot Cancer Panel v2 (Hotspot)

La comparaison des fréquences alléliques de mutations de l'EGFR retrouvées dans le liquide pleural (culots et surnageants) dans le kit LC et dans le kit Hotspot ne montre pas de différence significative ( $p=0,83$ ). On note néanmoins que certaines mutations ne sont détectées qu'avec le kit LC (flèches rouges, figures 4, 5 et 6).

Il n'y a pas de différence significative non plus concernant la qualité des résultats obtenus ( $p=0,11$ ). **En revanche lorsque l'on compare les profondeurs de séquençage, il existe une différence significative en faveur du kit LC ( $p=0,024$ )** (figure 7, les flèches rouges montrent les échantillons pour lesquels la profondeur est nettement plus importante en LC qu'en Hotspot). La flèche bleue indique un échantillon pour lequel la profondeur de lecture a été nettement meilleure avec le kit Hotspot.

Lorsque l'on s'intéresse aux **fréquences alléliques retrouvées dans le surnageant issu de la centrifugation des échantillons pleuraux, on observe une différence significative entre surnageant et culot cellulaire, en faveur du surnageant dans les deux kits ( $p=0,0047$  pour LC,  $p=0,02$  pour le Hotspot)** (figures 8 et 9, les flèches bleues indiquent les échantillons pour lesquels la mutation n'est retrouvée que dans le surnageant, pour chaque kit).

A noter que **le surnageant donne également de meilleurs résultats en termes de qualité ( $p=0,018$ ) que le culot cellulaire pour le kit LC**. Il n'y a pas de différence significative pour le kit Hotspot, ( $p=0,14$ ) (figures 10 et 11).

**Enfin, la profondeur de séquençage est supérieure dans le surnageant par rapport au culot via le kit LC ( $p=0,0047$ )**, (figure 12). Il n'y a pas de différence significative ( $p=0,09$ ) pour le kit Hotspot (figure 13).

## 2. Comparaison des fréquences alléliques selon le type d'échantillon

Avec le kit LC, il n'y a pas de différence significative entre les fréquences alléliques dans le plasma et dans le liquide pleural ( $p=0,23$ ).

**La différence est significative entre le plasma et le surnageant pleural avec  $p=0,019$ . Donc le surnageant issu de la centrifugation du liquide pleural est plus rentable en termes de fréquence allélique que le plasma si on utilise le kit LC.**

Avec le kit Hotspot on ne montre pas de différence entre les fréquences alléliques du plasma et du culot ( $p=0,35$ ), ni entre les fréquences alléliques du plasma et du surnageant ( $p=0,20$ ). (Figures 14 à 16).

## Discussion

Il s'agit d'une étude rétrospective, monocentrique, sur 28 patients avec les limitations inhérentes, mais représentative des pratiques habituelles d'un service de pneumologie de CHU, où l'accessibilité à un laboratoire réalisant des analyses NGS est actuellement plus aisée qu'en ville.

Les populations des études traitant du même sujet (22,23) avaient des caractéristiques globalement comparables, hormis l'ethnie; hors l'incidence des mutations de l'EGFR est de 40-55% dans la population asiatique versus 5-15% dans la population caucasienne (24).

Dans l'étude de Liping Liu (23) et dans celle de Lin Tong (22), les patients étaient plus jeunes (âge médian 60 ans et 63 ans), et il y avait plus de patients non-fumeurs (60% et 68%). Le taux de concordance entre la détection de mutation de l'EGFR dans le tissu tumoral et dans le liquide pleural était de 86,7%.

Concernant les sous-types histologiques des tumeurs que nous avons analysées, l'absence de carcinome épidermoïde parmi les 28 patients analysés n'est pas surprenante puisque dans cette population la prévalence des mutations de l'EGFR donnant accès à une thérapeutique est faible (3% selon le dépôt de dossier d'AMM du gefitinib à l'agence européenne du médicament), et la recherche de mutations n'est pas faite de manière systématique en pratique chez ces patients.

Une des limites de notre étude est l'absence de données analysables concernant les épanchements de faible abondance, puisqu'ils ne sont en général pas prélevés.

Il est également probable que les prélèvements tumoraux, plasmatiques et pleuraux aient été multipliés lorsqu'il s'agissait de patients non-fumeur, optimisant ainsi la probabilité d'obtenir un résultat positif contrairement aux patients fumeurs probablement sous-explorés alors qu'ils peuvent présenter une tumeur de l'EGFR ciblable par un TKI (7% des patients fumeurs selon le dépôt de dossier d'AMM du gefitinib à l'agence européenne du médicament).

Dans notre étude, il est intéressant de noter que la moitié des patients avec une mutation de l'EGFR étaient fumeurs. Nous n'avons malheureusement pas pu détailler la consommation tabagique de nos patients en l'absence de données suffisantes. Le renseignement systématique de ces données dans le dossier des patients permettrait d'affiner les corrélations entre le statut tabagique et le profilage moléculaire tumoral.

Les délétions au sein de l'exon 19, et la mutation L858R dans l'exon 21 représentent à elles seules 85 % des mutations du gène EGFR. Ce sont les mutations responsables de la sensibilité tumorale aux TKI. D'autres mutations impliquées peuvent être également recherchées mais elles sont nettement plus rares. Inversement, on sait que les mutations des exons 18 à 21 ne sont pas toutes liées à une sensibilité accrue aux TKI. **Ainsi une recherche ciblée de mutation est plus pertinente et rentable qu'un séquençage large.**

En ce qui concerne la recherche de la mutation de l'EGFR chez des patients suivis pour un cancer broncho pulmonaire, le panel Lung and Colon qui comporte une vingtaine de gènes semble plus performant que le panel Hotspot (une quarantaine de gènes) dans le liquide pleural.

**La profondeur de séquençage dans le liquide pleural est supérieure avec le kit LC.** Il s'agit du rapport entre la longueur des séquences mises bout à bout et la longueur du génome cible. Plus la profondeur de séquençage est importante, moins il y a de lacunes de lecture du génome.



**Quel que soit le panel utilisé, la fréquence allélique dans le surnageant du liquide pleural centrifugé est significativement supérieure à celle du culot cellulaire, ce qui corrobore les résultats obtenus par l'équipe de Lin Tong (22), et ceux de l'équipe de Dan Liu (87,8% de concordance avec le tissu tumoral)(25).**

L'étude menée par Ping Zhang (26) met également en évidence un taux de détection de mutations supérieur dans les surnageants de divers liquides (liquide pleural, ascite, liquide péricardique, liquide cérébrospinal) par rapport au plasma.

Ces données plaident pour une analyse du liquide pleural en routine pour tous les patients présentant un épanchement prélevable, dans le cadre du diagnostic de carcinome bronchique non à petites cellules, ou lors de la progression sous traitement, et ce d'autant plus qu'il s'agit de patients jeunes et/ou non-fumeurs. En effet, la mise en évidence d'une mutation d'intérêt de l'EGFR donne accès à une ligne de traitement par TKI, dont on sait le bénéfice en terme de pronostic et de qualité de vie (12). Les délais analytiques d'un surnageant pleural ou d'un plasma (7 jours en moyenne contre 14 jours en moyenne pour les biopsies tissulaires) constituent un argument supplémentaire en faveur de leur utilisation.

Ajoutons enfin qu'un épanchement pleural est fréquemment présent au diagnostic ou au cours de l'évolution de cancers du sein, des ovaires ou encore de l'estomac (27), ce qui renforce l'intérêt de son analyse par NGS en routine.

## Conclusion

Notre étude est en accord avec les données de la littérature, confirmant l'intérêt de l'analyse NGS du liquide pleural pour la recherche de mutations d'intérêt thérapeutique.

Le kit Lung and Colon comportant une vingtaine de gènes est supérieur en termes de profondeur de séquençage par rapport au panel Hotspot comportant une quarantaine de gènes. Nos résultats confirment qu'un prélèvement pleural, et plus particulièrement le surnageant pleural est au moins aussi performant en termes de fréquence allélique qu'un prélèvement plasmatique. Ce prélèvement a permis de corriger la négativité de l'analyse du plasma chez 45% des patients EGFR mutés de notre étude, avec un impact majeur sur le choix thérapeutique. Le plasma et le liquide pleural sont des échantillons accessibles en routine de manière itérative et peu invasive, et permettent de compléter le prélèvement tumoral tissulaire tout en réduisant les délais analytiques à moins d'une semaine.

L'analyse NGS du liquide pleural a donc toute sa place en pratique clinique pour la prise en charge des carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules, au diagnostic comme à la progression tumorale.

## Bibliographie

1. Horner MJ et coll. SEER Cancer statistics review, 1975-2006, National Cancer Institute. Bethesda, MD.
2. Recommandations professionnelles Cancer du poumon non à petites cellules Formes localisées non opérables, localement avancées et métastatiques. Collection Recommandations & référentiels, INCa, Boulogne-Billancourt, septembre 2010.
3. Wu Y-L, Zhou C, Hu C-P, Feng J, Lu S, Huang Y, et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* févr 2014;15(2):213-22.
4. Barlesi F, Mazieres J, Merlio J-P, Debieuvre D, Mosser J, Lena H, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *The Lancet.* avr 2016;387(10026):1415-26.
5. Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, et al. Screening for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *N Engl J Med.* 3 sept 2009;361(10):958-67.
6. Ruppert A-M, Wislez M, Poulot V, Lacave R, Antoine M, Cadranel J. Un regard simple sur la biologie du cancer bronchique : EGFR. *Rev Mal Respir.* avr 2011;28(4):565-77.
7. Lynch TJ, Okimoto RA, Supko JG, Settleman J. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N Engl J Med.* 2004;11.
8. Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, Yang C-H, Chu D-T, Saijo N, et al. Gefitinib or Carboplatin-Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 3 sept 2009;361(10):947-57.
9. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* mars 2012;13(3):239-46.
10. Sequist LV, Yang JC-H, Yamamoto N, O'Byrne K, Hirsh V, Mok T, et al. Phase III Study of Afatinib or Cisplatin Plus Pemetrexed in Patients With Metastatic Lung Adenocarcinoma With *EGFR* Mutations. *J Clin Oncol.* 20 sept 2013;31(27):3327-34.
11. Lee CK, Davies L, Wu Y-L, Mitsudomi T, Inoue A, Rosell R, et al. Gefitinib or Erlotinib vs Chemotherapy for EGFR Mutation-Positive Lung Cancer: Individual Patient Data Meta-Analysis of Overall Survival. *JNCI J Natl Cancer Inst [Internet].* juin 2017 [cité 24 avr 2020];109(6). Disponible sur: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djw279>

12. Ramalingam SS, Yang JC-H, Lee CK, Kurata T, Kim D-W, John T, et al. Osimertinib As First-Line Treatment of *EGFR* Mutation-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 20 mars 2018;36(9):841-9.
13. Soria J-C, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH, et al. Osimertinib in Untreated *EGFR* -Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 11 janv 2018;378(2):113-25.
14. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, et al. Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR-TKI Therapy in 155 Patients with EGFR-Mutant Lung Cancers. *Clin Cancer Res*. 15 avr 2013;19(8):2240-7.
15. nccn guidelines
16. Porcel JM, Gasol A, Bielsa S, Civit C, Light RW, Salud A. Clinical features and survival of lung cancer patients with pleural effusions: Pleural effusions in lung cancer. *Respirology*. mai 2015;20(4):654-9.
17. Porcel JM, Esquerda A, Vives M, Bielsa S. Etiology of Pleural Effusions: Analysis of More Than 3,000 Consecutive Thoracenteses. *Arch Bronconeumol Engl Ed*. mai 2014;50(5):161-5.
18. Wozniak, AJ, Gadgeel, SM, Pass, HI. "Clinical presentation of non-small cell carcinoma of the lung". *Principles and Practice of Lung Cancer*. 2010. pp. 327-340.
19. AmpliSeq-Colon-Lung-Cancer-Panel (document technique Thermo Fisher Scientific).
20. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. déc 2013;98(6):236-8.
21. Guan Y, Wang ZJ, Wang LQ, Hua DF, Liu J. Comparison of EGFR mutation rates in lung adenocarcinoma tissue and pleural effusion samples. *Genet Mol Res [Internet]*. 2016 [cité 16 févr 2020];15(2). Disponible sur: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2016/vol15-2/pdf/gmr7001.pdf>
22. Tong L, Ding N, Tong X, Li J, Zhang Y, Wang X, et al. Tumor-derived DNA from pleural effusion supernatant as a promising alternative to tumor tissue in genomic profiling of advanced lung cancer. *Theranostics*. 2019;9(19):5532-41.
23. Liu L, Shao D, Deng Q, Tang H, Wang J, Liu J, et al. Next generation sequencing-based molecular profiling of lung adenocarcinoma using pleural effusion specimens. *J Thorac Dis*. mai 2018;10(5):2631-7.
24. Skov BG, Høgdall E, Clementsen P, Krasnik M, Larsen KR, Sørensen JB, et al. The prevalence of EGFR mutations in non-small cell lung cancer in an unselected Caucasian population. *APMIS*. févr 2015;123(2):108-15.
25. Liu D, Lu Y, Hu Z, Wu N, Nie X, Xia Y, et al. Malignant Pleural Effusion Supernatants Are Substitutes for Metastatic Pleural Tumor Tissues in EGFR Mutation Test in Patients with Advanced Lung Adenocarcinoma. *Kato M, éditeur. PLoS ONE*. 28 févr 2014;9(2):e89946.

26. Zhang P, Wu X, Tang M, Nie X, Li L. Detection of *EGFR* gene mutation status from pleural effusions and other body fluid specimens in patients with lung adenocarcinoma. *Thorac Cancer*. déc 2019;10(12):2218-24.
27. Zhou S, Xu B, Qi L, Zhu D, Liu B, Wei J. Next-generation sequencing reveals mutational accordance between cell-free DNA from plasma, malignant pleural effusion and ascites and directs targeted therapy in a gastric cancer patient. *Cancer Biol Ther*. 2 janv 2019;20(1):15-20.
28. Kohno T, Nakaoku T, Tsuta K, Tsuchihara K, Matsumoto S, Yoh K, et al. Beyond ALK-RET, ROS1 and other oncogene fusions in lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2015;4(2):9.

## Tableaux

Caractéristiques clinico-pathologiques des patients et échantillons (n=28)	
Caractéristique	Valeur
Age au diagnostic, années	
Médian	74
Intervalle	43-93
Sexe, n (%)	
Masculin	14 (50)
Féminin	14 (50)
Tabagisme, n (%)	
Fumeur	15 (53,5)
Non-fumeur	12 (42,8)
Score OMS, n (%)	
0	2 (7)
1	14 (50)
2	9 (32)
3	0
4	1 (3,5)
Histologie, n (%)	
Adénocarcinome	24 (85,7)
Epidermoïdes	0
Non à petites cellules	4 (14%)
Extension au diagnostic, n (%)	
Localisé	1 (3,5)
Oligo métastatique	3 (10,7)
Multi métastatique	23 (82)
Inconnu	1 (3,5)
Statut PDL-1, n (%)	
<1%	7 (25)
1-50%	4 (14)
>50%	4 (14)
Inconnu	13 (46)

Tableau 1

Circonstances du diagnostic	
Matériel prélevé, n (%)	Valeur
Nodule pulmonaire	12 (42,8)
Liquide pleural	14 (50)
Métastase	1 (3,5)
Autres	1 (3,5)
Méthode de prélèvement, n (%)	
Fibroscopie bronchique	9 (32)
Biopsie transcutanée	3 (10,7)
Ponction pleurale	14 (50)
Chirurgie	2 (7)

Tableau 2

Caractéristiques de l'épanchement pleural	
Latéralité, n (%)	Valeur
Unilatéral droit	10 (37,5)
Unilatéral gauche	11 (39)
Bilatéral	7 (25)
Abondance, n (%)	
Faible	2 (7)
Moyenne	12 (42,8)
Grande	14 (50)

Tableau 3

Traitements	
Lignes de traitement reçues au total, n (%)	Valeur
0	9 (32)
1	13 (46)
2	2 (7)
>2	3 (10,7)
NC	1 (3,5)
Ligne de traitement avant prélèvement pleural (PP), n (%)	
0	22 (78,5)
1	2 (7)
2	1 (3,5)
>2	2 (7)
NC	1 (3,5)
Ligne de traitement après PP, n (%)	
0	9 (32)
1	17 (60,7)
2	1 (3,5)
>2	0
NC	1 (3,5)

Tableau 4

Altération/association	
Altération(s), n (%)	Valeur
ALK	2 (7)
EGFR	8 (28,5)
Kras	1 (3,5)
TP53	4 (14)
EGFR+KRas	2 (7)
KRas+MET	1 (3,5)
BRAF+TP53	1 (3,5)
EGFR+PIK3CA	1 (3,5)
TP53+Kras+JAK3	1 (3,5)

Tableau 5



## Figures

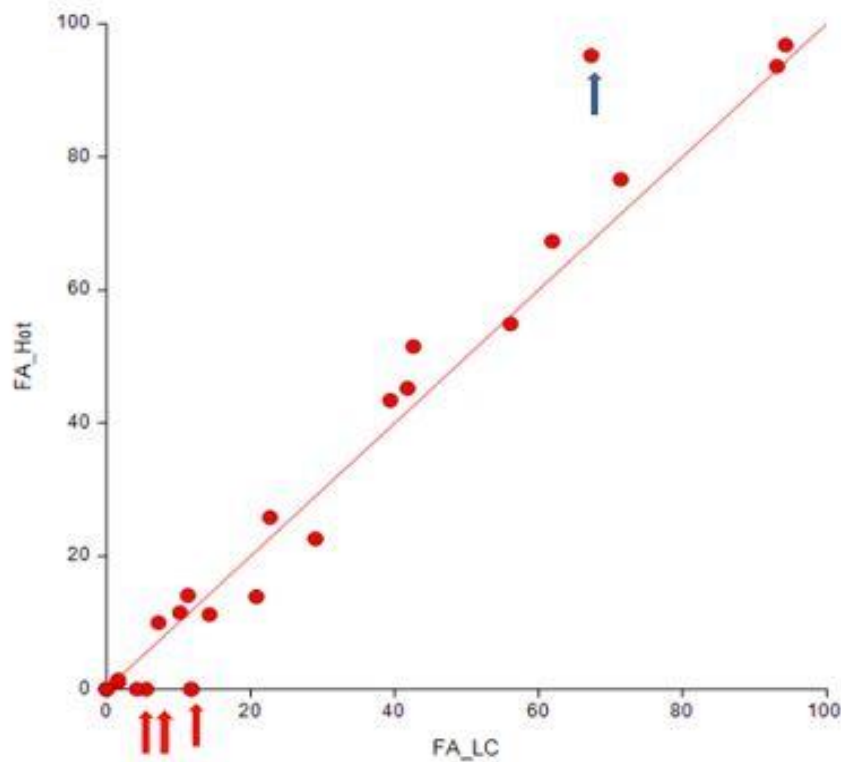


Figure 4 : FA avec le kit hotspot dans le liquide pleural (culots + surnageants) en ordonnée, et FA avec le kit LC dans le liquide pleural (culots + surnageants) en abscisse.

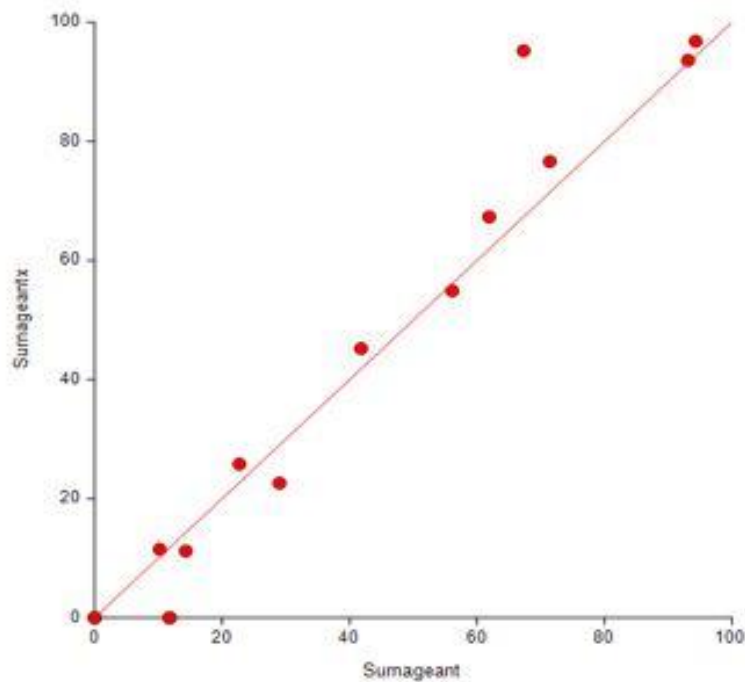


Figure 5 : FA kit hotspot liquide pleural (surnageants) en ordonnée, et kit LC liquide pleural (surnageants) en abscisse.

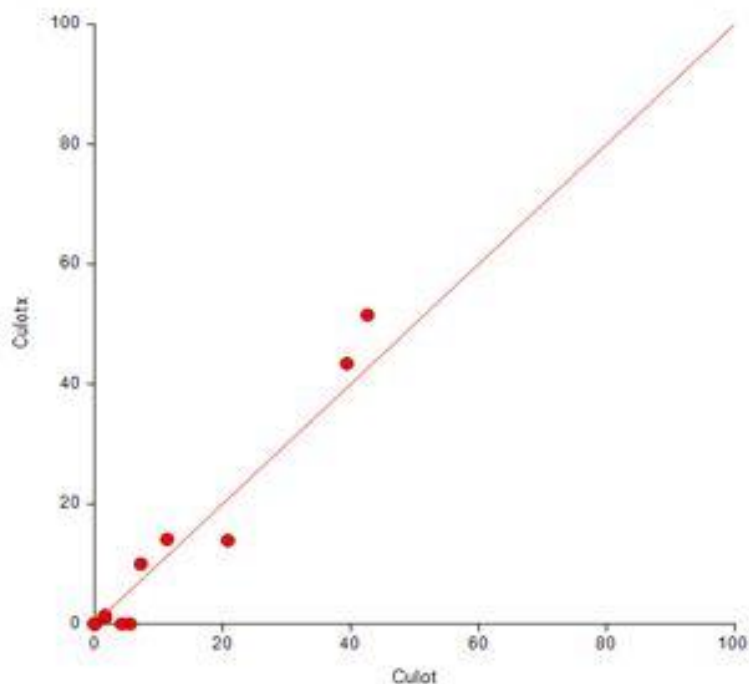


Figure 6 : FA kit hotspot liquide pleural (culots) en ordonnée, et kit LC liquide pleural (culots) en abscisse.

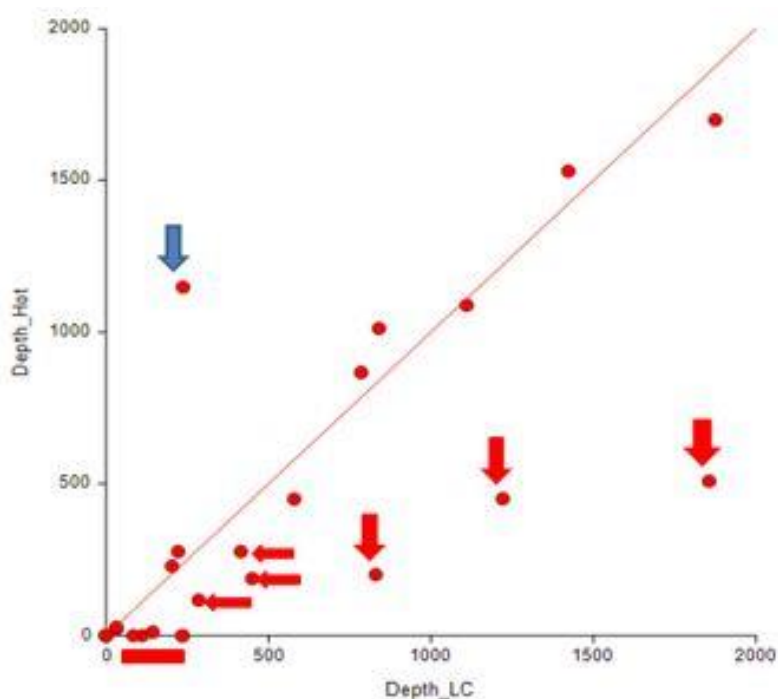


Figure 7 : profondeur de séquençage (culot et surnageant) dans le kit Hotspot en ordonnée, profondeur de séquençage (culot et surnageant) dans le kit LC en abscisse.

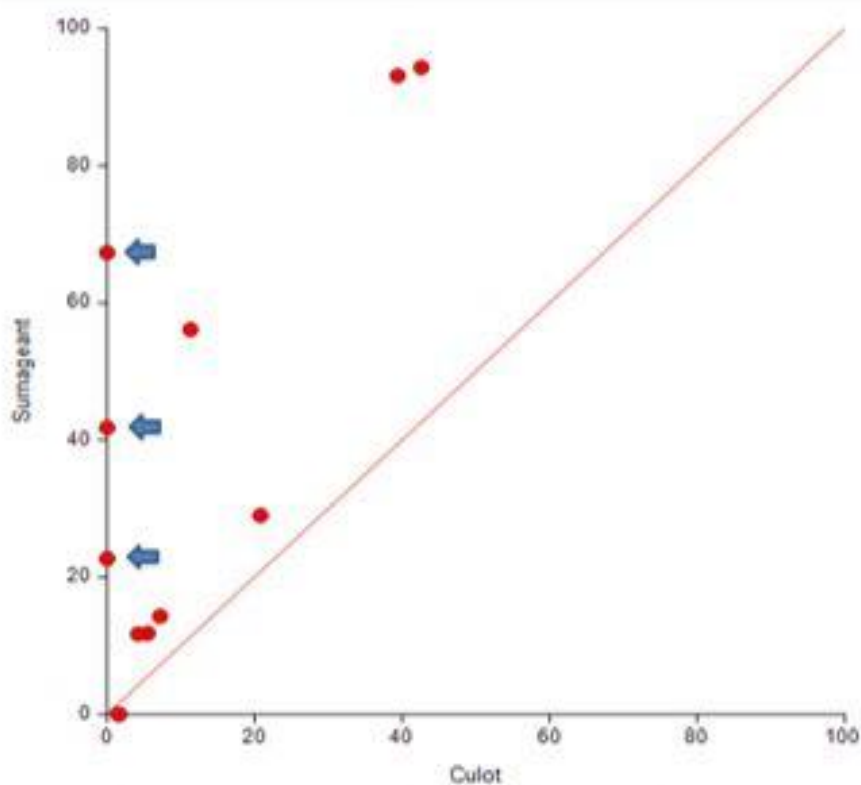


Figure 8 : FA dans le surnageant kit LC en ordonnée, FA dans le culot kit LC en abscisse

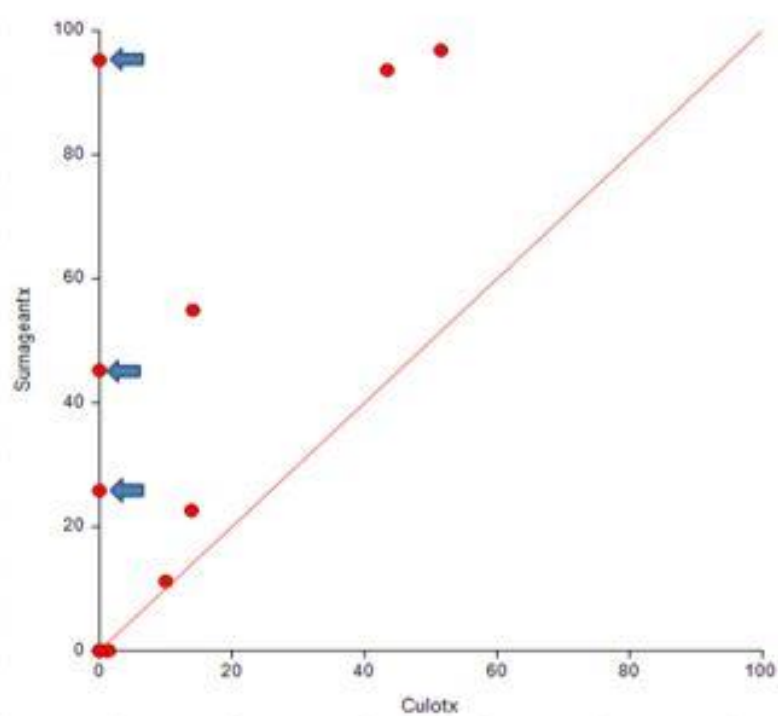


Figure 9 : FA dans le surnageant kit Hotspot en ordonnée, FA dans le culot kit Hotspot en abscisse.

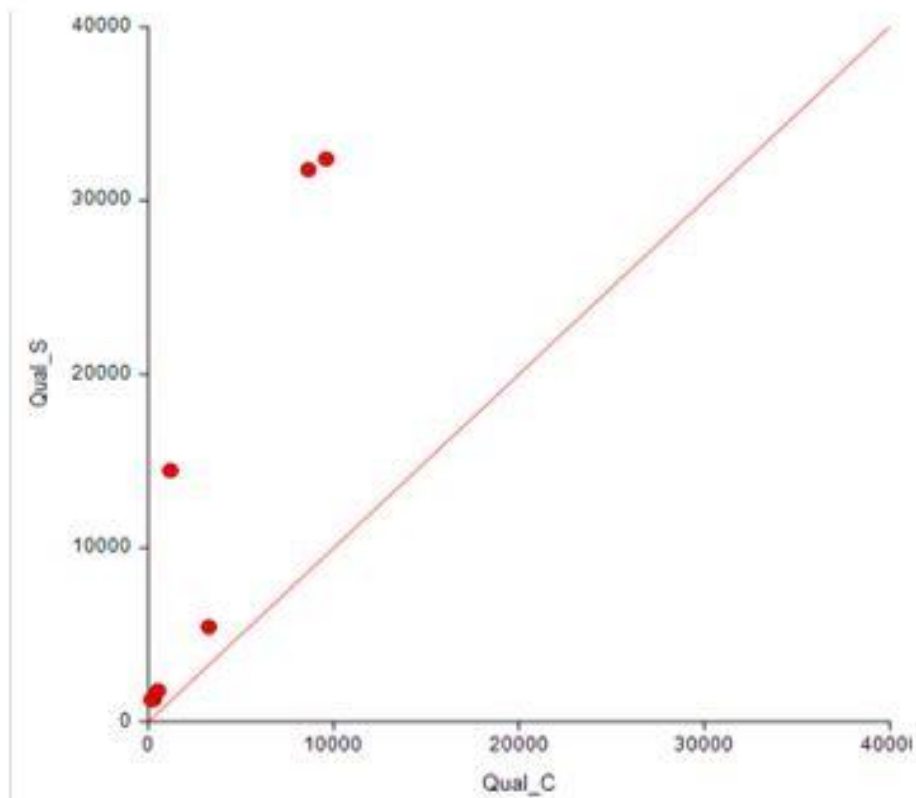


Figure 10 : qualité du surnageant en ordonnée, qualité du culot en abscisse, dans le kit LC.

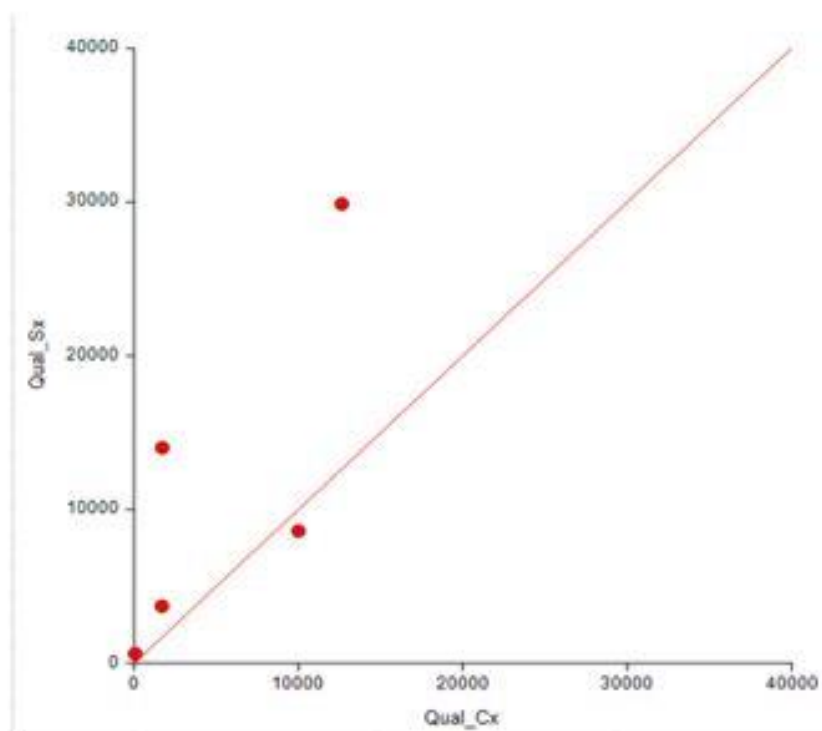


Figure 11 : qualité du surnageant en ordonnée, qualité du culot en abscisse, dans le kit Hotspot.

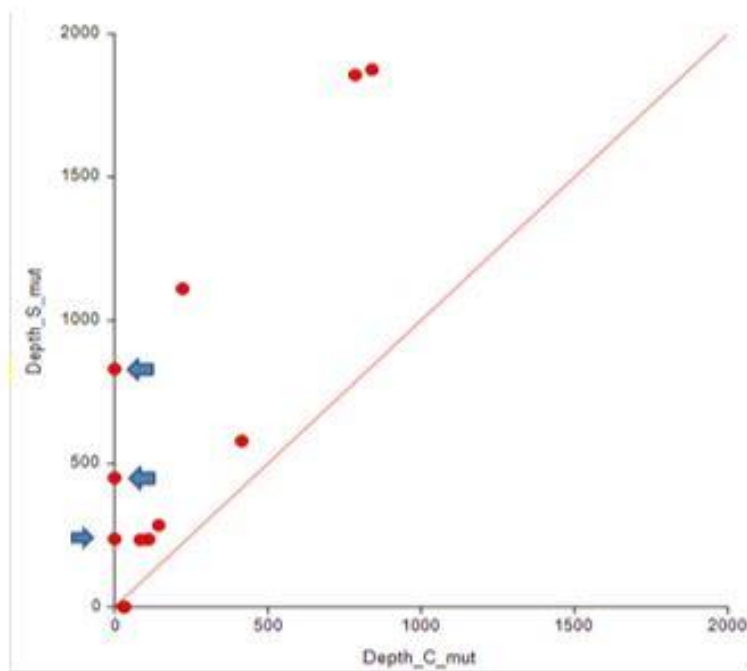


Figure 12 : profondeur de séquençage dans le surnageant en ordonnée, profondeur de séquençage dans le culot en abscisse.

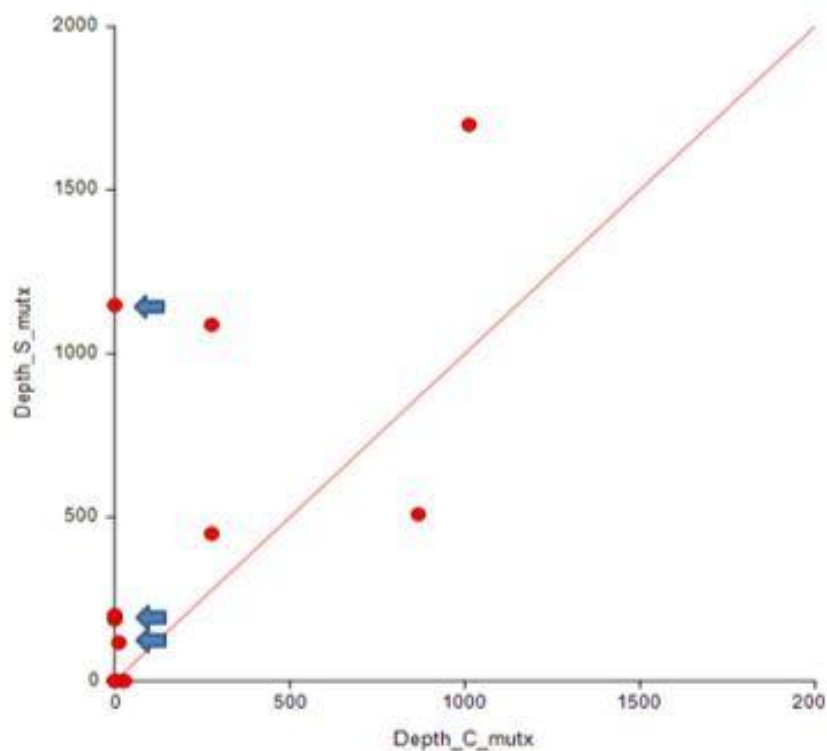


Figure 13 : profondeur de séquençage dans le surnageant en ordonnée, profondeur de séquençage dans le culot cellulaire en abscisse.

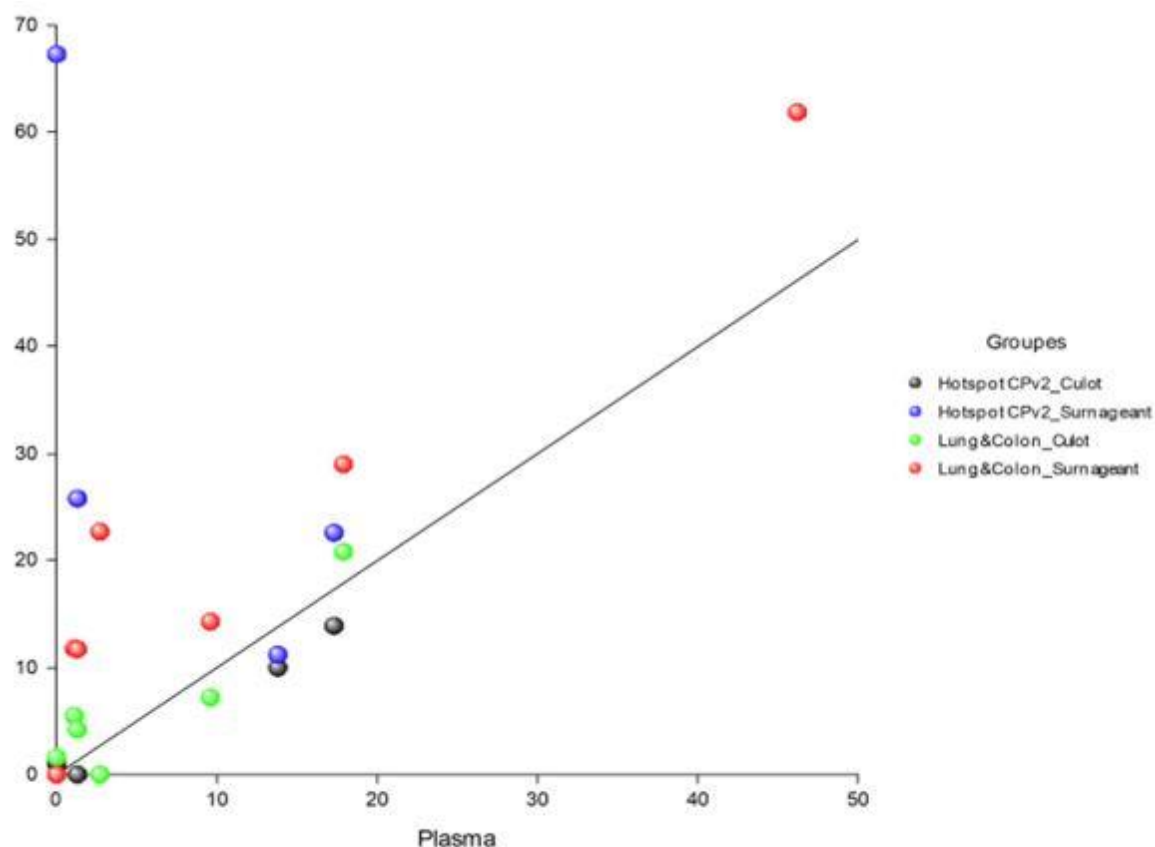


Figure 14 : Fréquences alléliques selon les échantillons : plasma en abscisse et liquide pleural en ordonnée.

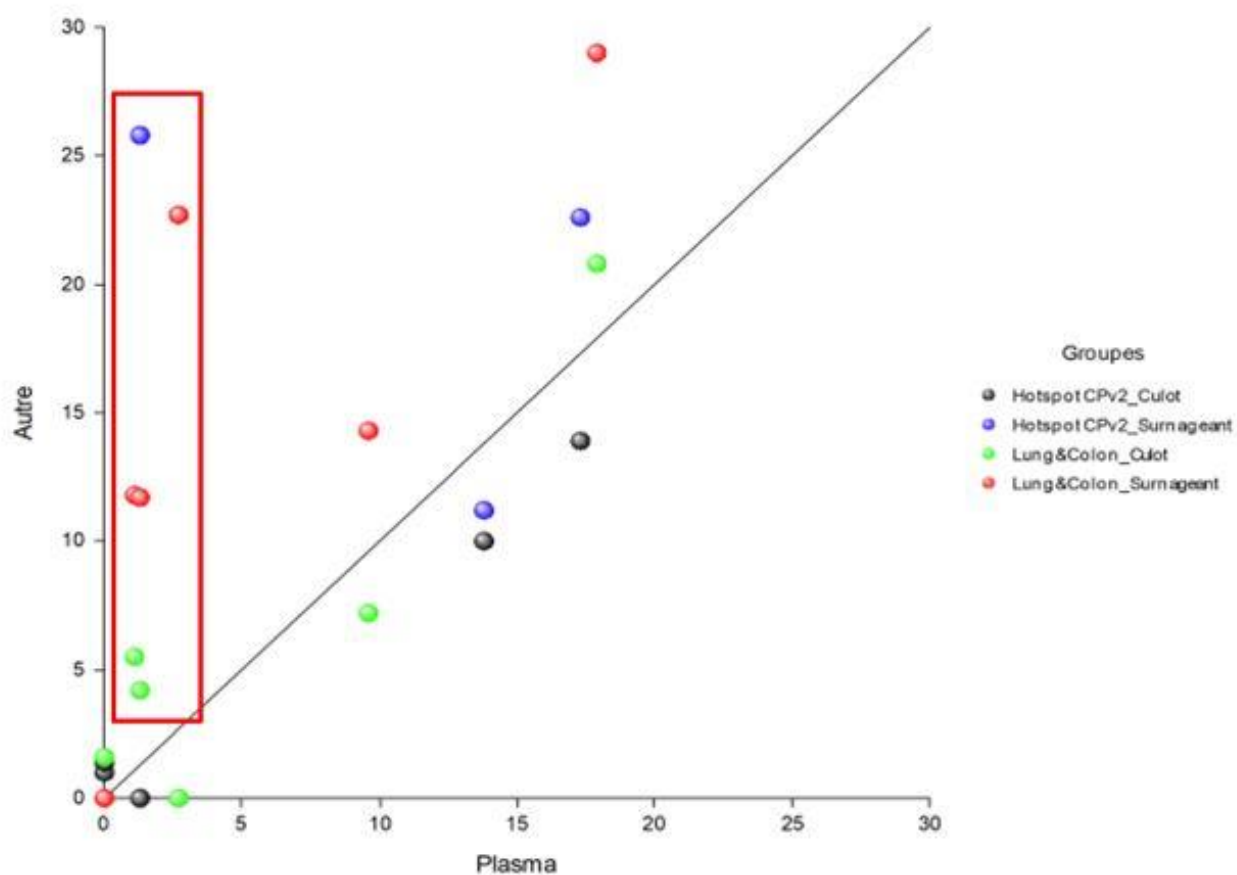


Figure 15 : Fréquences alléliques selon les échantillons : plasma en abscisse et liquide pleural en ordonnée.

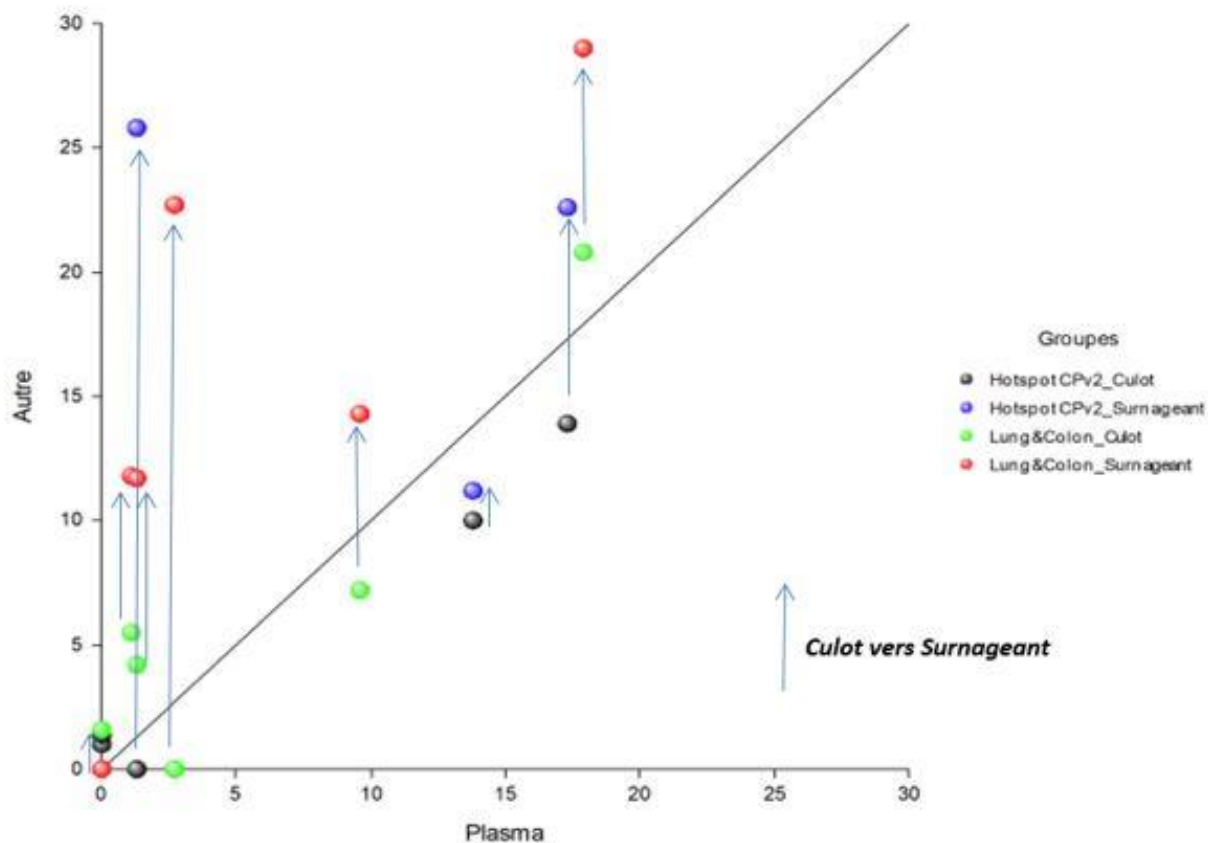
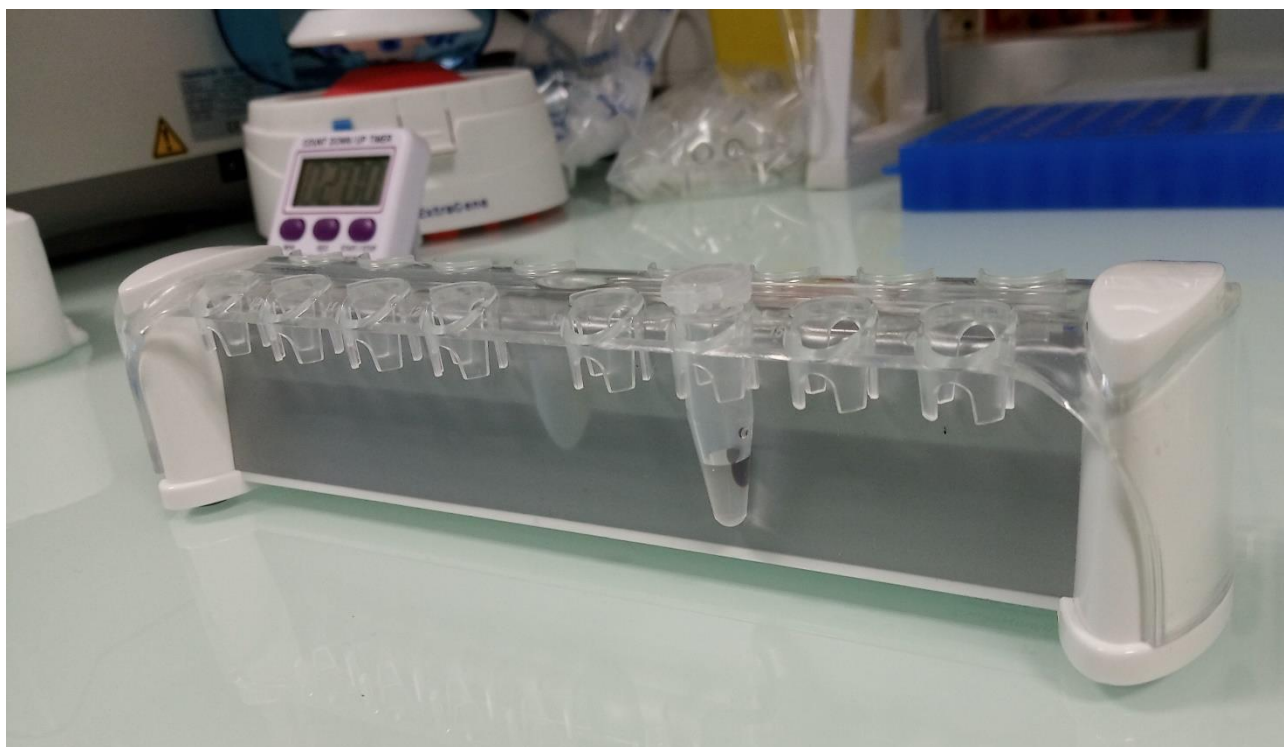


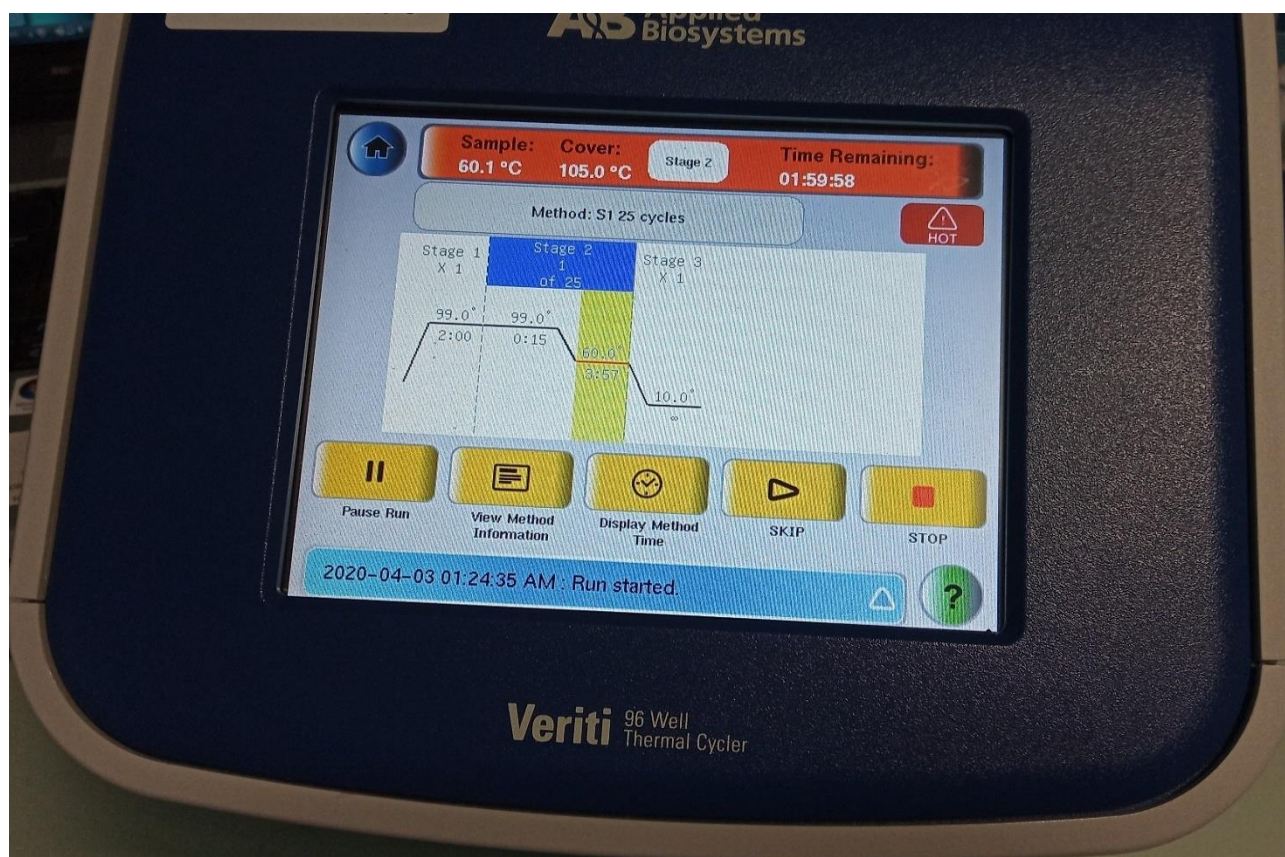
Figure 16 : Fréquences alléliques selon les échantillons : plasma en abscisse et liquide pleural en ordonnée.



## ANNEXES

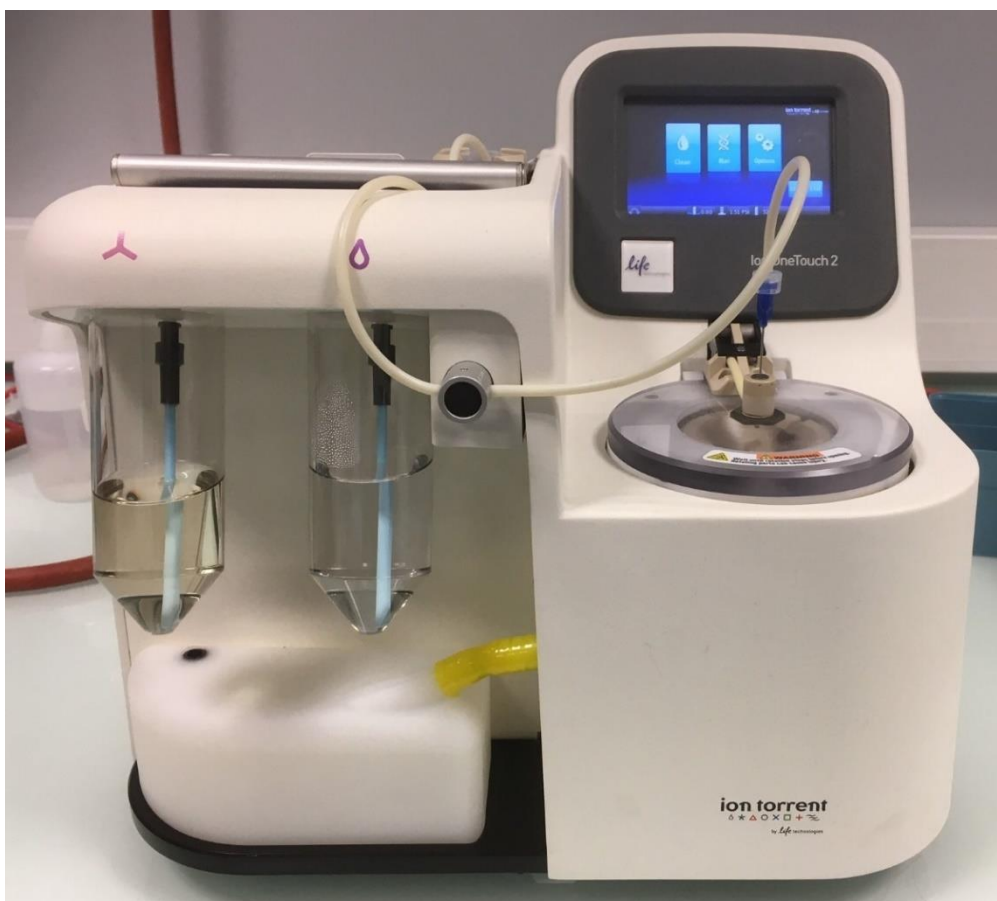


Annexe 1 : Préparation de l'ADN.



Annexe 2 : amplification de l'ADN (PCR)

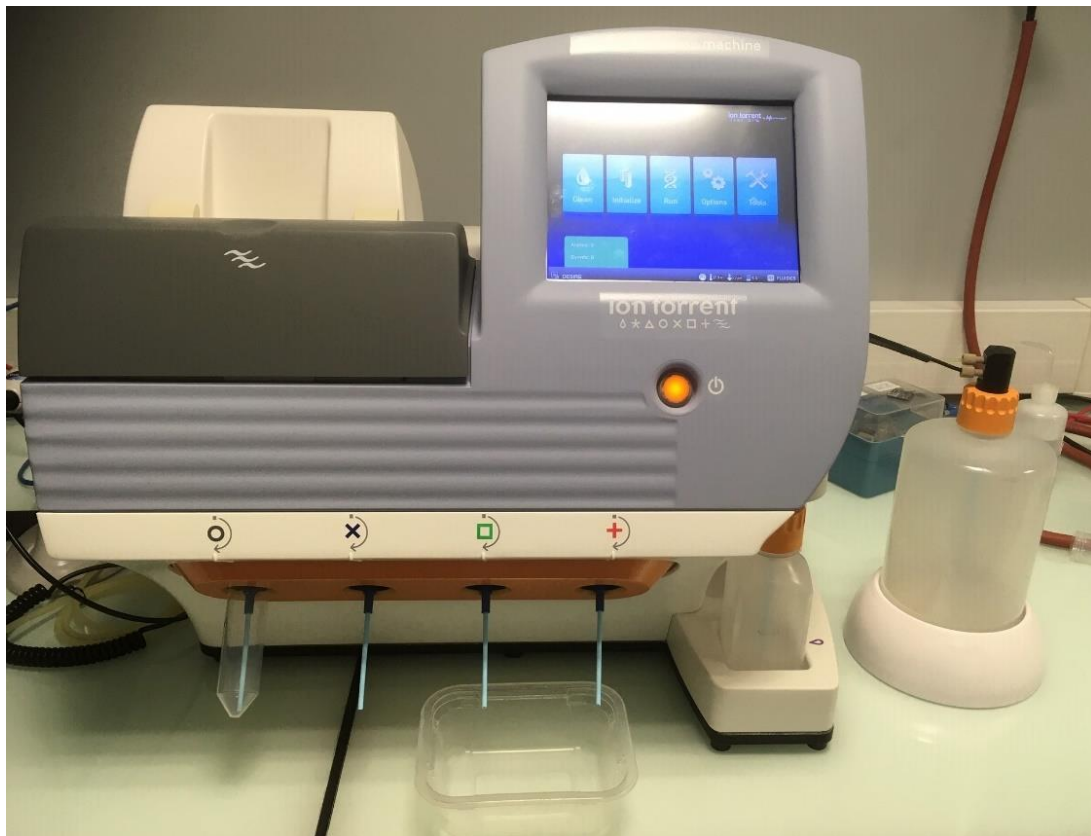




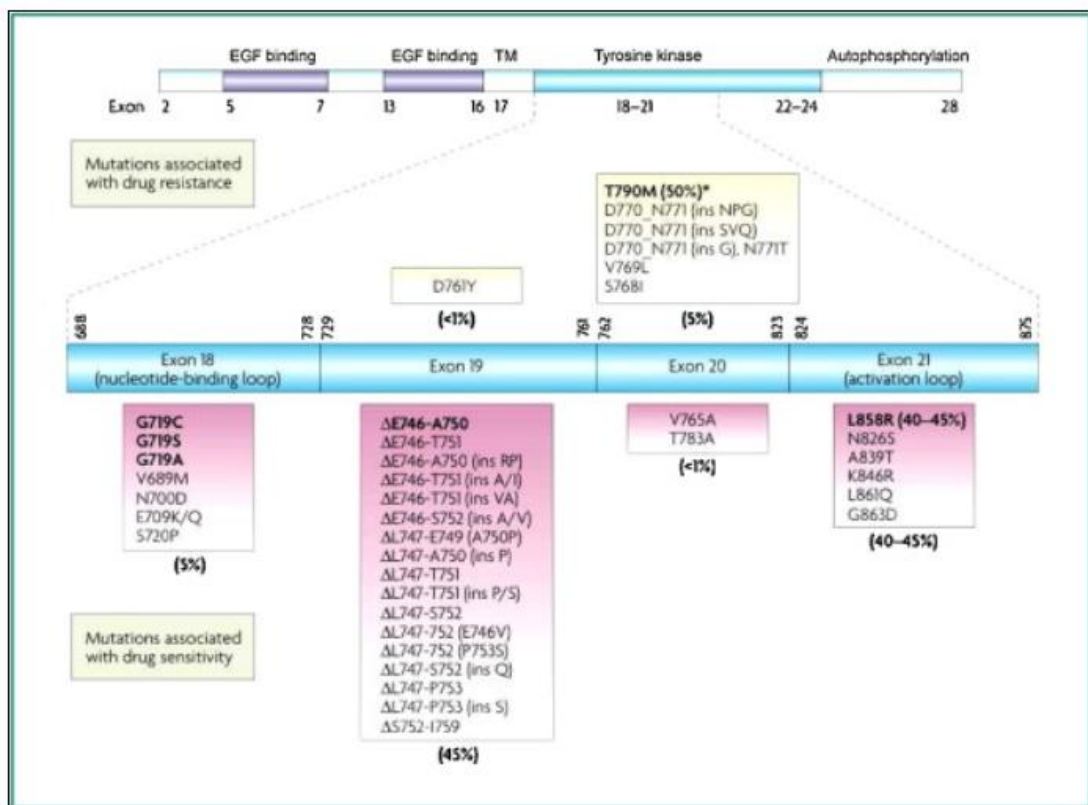
Annexe 3 : Préparation de la puce avant séquençage



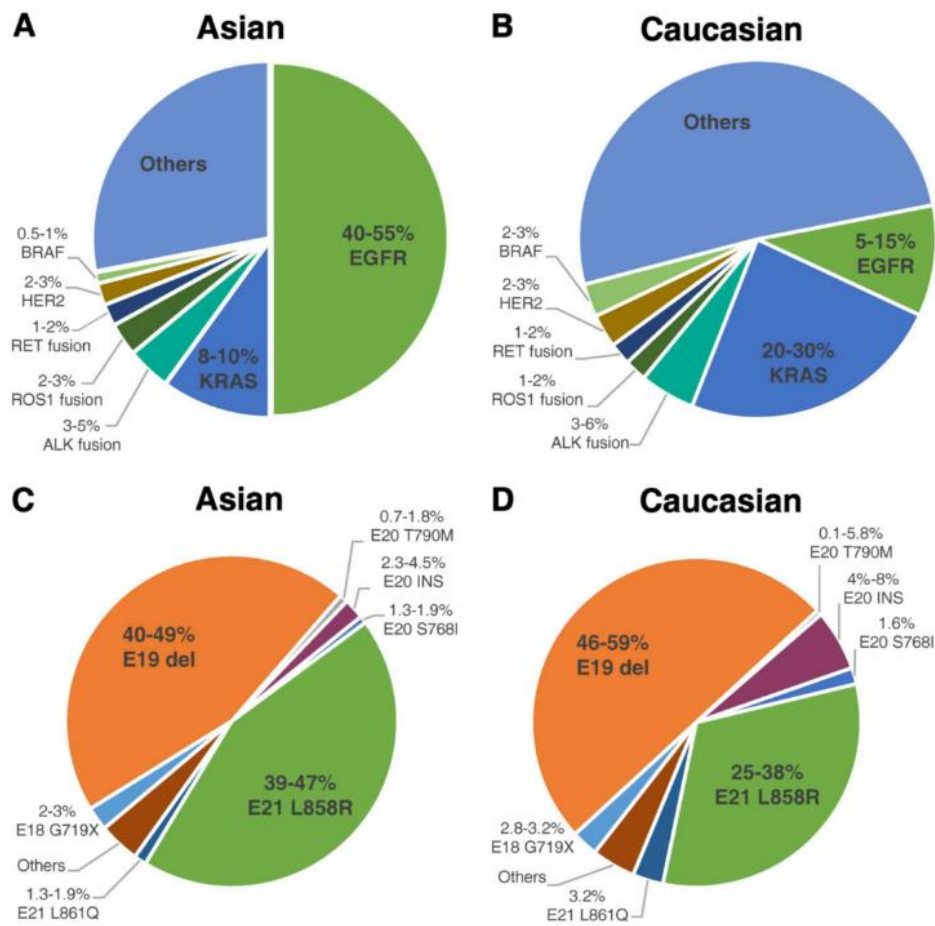
Annexe 4 : Puce support de séquençage



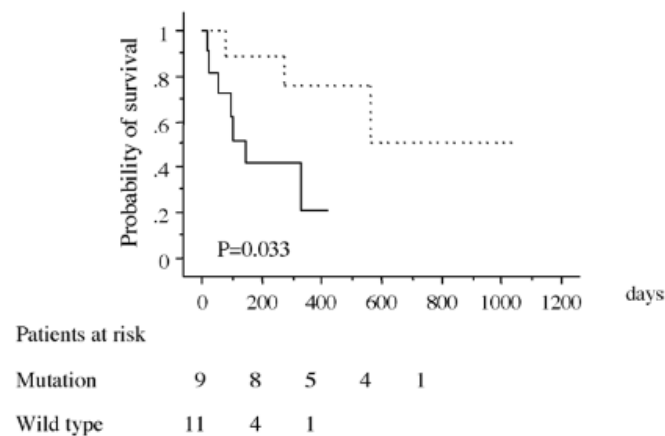
Annexe 5 : Séquençage



Annexe 6 : Les mutations oncogéniques de l'*Epidermal Growth Factor Receptor* dans le cancer bronchique. D'après Sharma SV, Nature Reviews Cancer 2007;7:169–181



Annexe 7 : Kohno 2015, Skov 2015 (24,28)



**Fig. 1** Survival curves of cancer patients with either mutations of EGFR or wild type. The overall 1-year survival rate for the patients with mutations of EGFR (dotted line) and wild type (solid line) was 76.2 and 20.8%, respectively ( $p = 0.033$ ).

Annexe 8 : Epidermal growth factor receptor mutations are associated with gefitinib sensitivity in non-smallcell lung cancer in Japanese, H. Uramoto et al.,

# Table des matières

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>5</b>
Ethique.....	5
Population étudiée.....	5
Prélèvements et extraction d'ADN.....	5
Préparation de la librairie ou préparation de l'ADN pour le séquençage.....	7
PCR en émulsion .....	7
Séquençage.....	8
Analyses des données.....	8
<b>RESULTATS .....</b>	<b>9</b>
Données cliniques et paracliniques .....	9
Données moléculaires.....	11
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>12</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>14</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>16</b>
<b>TABLEAUX .....</b>	<b>19</b>
<b>FIGURES.....</b>	<b>20</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>29</b>
.....	32

L'apparition d'un épanchement pleural est un événement fréquent au cours de l'histoire naturelle du cancer broncho-pulmonaire. Son prélèvement est un geste simple et peu invasif.

L'analyse NGS permet de détecter des mutations d'intérêt thérapeutique en cancérologie, et notamment la présence de mutations de l'EGFR accessibles à une thérapie ciblée par tyrosine kinase inhibiteur. Cette technique est actuellement utilisée en routine pour analyser le tissu tumoral et le plasma, mais il existe peu de données concernant son utilisation pour le liquide pleural.

Dans cette étude, nous avons étudié la précision et l'efficacité de la détection de mutations dans le liquide pleural chez 28 patients atteints d'un carcinome bronchique non à petites cellules ayant eu une analyse NGS du liquide pleural entre 2017 et 2020. Le kit Lung and colon est plus performant que le kit Hotspot en termes de profondeur de séquençage, et les deux kits sont plus performants en termes de fréquences alléliques dans le surnageant que dans le culot issu de la centrifugation du liquide pleural. La sensibilité est équivalente à celle du plasma. Chez 63,6% des patients avec une mutation EGFR, celle-ci n'était mise en évidence que dans le liquide pleural et/ou dans le plasma, démontrant l'utilité d'associer des biopsies liquides aux biopsies tumorales parfois non réalisables en pratique clinique. Chez 45% des patients mutés EGFR de notre étude, l'altération a été mise en évidence uniquement sur le liquide pleural, permettant de guider la thérapeutique de première ligne. Il semble donc que l'analyse NGS du surnageant du liquide pleural constitue un apport non négligeable dans la recherche de mutations d'intérêt thérapeutique chez les patients porteurs d'un carcinome bronchique non à petites cellules.

**mots-clés :** cancer broncho-pulmonaire, adénocarcinome, EGFR, épanchement pleural, tyrosine kinase inhibiteur, NGS, T790M, détection de panel de gènes, next generation sequencing, médecine de précision en oncologie

# ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) .....  
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une  
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,  
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.  
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées  
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **jj** / **mm** / **aaaa**