

D'après une communication de

Michèle BEAU-FALLER

Biologiste, PU-PH,
MD, PhD.**Expertise :**

Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire. Laboratoire d'Oncobiologie Plateforme de génomique des Cancers d'Alsace EA 3430 Groupe « Marqueurs moléculaires de progression tumorale et de sensibilité aux drogues anticancéreuses ».

Déclaration publique d'intérêts :

Aucun.

Correspondance :CHU Strasbourg
1 Place de l'Hôpital
67000 Strasbourg
michele.faller@chru-strasbourg.fr

Mieux connaître les mutations de l'EGFR diagnostiquées en France

Les mutations sur le domaine des tyrosines kinases sont récurrentes sur les localisations 18, 19, 20 et 21 de l'EGFR. Elles se répartissent avec des fréquences variant selon les exons (de 2 à 45 %), les plus rares concernant les exons 18 et 20. Les actions 6.2 (conforter l'accès aux tests moléculaires) et 5.6 (adapter les essais cliniques aux évolutions conceptuelles induites par l'arrivée des thérapies ciblées) du Plan cancer 3 confirment les enjeux et perspectives liés à la détermination de ces mutations. Cela passe notamment par le développement de nouvelles technologies au niveau des plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers et l'harmonisation des comptes rendus des résultats de recherche de biomarqueurs.

Les plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers

Organisation

Créées et soutenues par la DGOS et l'INCa depuis 2006, elles sont au nombre de 28 réparties sur le territoire, chacune disposant d'experts par type d'analyse. L'INCa a publié en novembre 2014 une synthèse d'activité 2013⁽¹⁾ : 89 000 tests ont été réalisés pour 65 000 patients. La recherche de mutations d'EGFR dans le cancer du poumon a fait l'objet de campagnes d'évaluation externe de la qualité ou EEQ (en 2012 et 2013) par le consortium commun Gen&Tiss. À noter l'excellence des résultats 2012 avec 89 % de génotypages exacts, sans erreur (figure 1). En 2013, il a été observé 64 % de génotypages exacts du fait de nouvelles exigences : les erreurs correspondent à des nomenclatures inexactes des délétions de l'exon 19 (mais cela n'a pas de répercussion sur la prise en charge des patients) et à deux échantillons avec mutation rare de l'EGFR au niveau de l'exon 18 (cet exon n'est pas systématiquement analysé sur toutes les plateformes).

Les comptes rendus

Ils doivent informer du type de méthodologie utilisée avec des informations sur la sensibilité de la technique ainsi que la liste des mutations recherchées ; ils devraient également interpréter les résultats que l'on soit en présence de mutation ou d'échantillon non muté (ou sauvage, *wild-type*).

Bilan d'activité de recherche de marqueurs prédictifs

Le nombre de recherches de mutations EGFR a augmenté depuis 2008 (1 269 recherches de mutations EGFR) pour atteindre un plateau depuis 2012, avec en 2013, 23 336 recherches de mutations EGFR. Il s'agit de l'anomalie moléculaire la plus fréquemment recherchée à l'heure actuelle en vue d'une prescription de thérapie ciblée, quelle que soit la pathologie ou le biomarqueur considéré. L'origine des prescriptions est quasiment également répartie entre les différents secteurs d'activité (établissement hospitalier hébergeant une plateforme ou non, ou établissement privé) avec une très bonne couverture géographique.

Les méthodes génomiques

Les techniques de biologie moléculaire peuvent être schématiquement réparties en deux groupes : d'une part celles réalisées sans « *a priori* » comme le séquençage direct (ou Sanger) ou l'HRM (*High Resolution Melting Analysis*) et d'autre part les techniques ciblées, entre autres le pyro-séquençage, la PCR spécifique d'allèle, ou l'analyse de fragment, qui sont des techniques plus rapides et plus sensibles.

D'un autre côté, il faut se rappeler qu'un échantillon peut être hétérogène⁽²⁾ aussi bien en termes de représentativité au regard de la maladie globale du patient qu'en termes de cellularité tumorale mais aussi d'amplification d'allèle (muté ou sauvage) (figure 2)⁽³⁾.

Les programmes d'assurance qualité ERMETIC 1 (STIC 2005) et 2 (2011)

Ces programmes comparent les résultats de différents centres à celui d'un laboratoire indépendant. ERMETIC 1 a évalué la technique du séquençage sur des échantillons de cancers bronchiques non à petites cellules inclus en paraffine, pour la recherche des mutations EGFR et KRAS^(4,5).

RÉSULTATS DE GÉNOTYPAGE D'EGFR DANS LE CANCER DU POUMON

	Campagne 2012 / 45 participants			Campagne 2013 / 45 participants		
	Nombre échantillons	Erreurs génotype	Erreur nomencl.	Nombre échantillons	Erreurs génotype	Erreur nomencl.
Non muté	5	1	0	4	1	0
Mut ex 18	0	0	0	2	12	0
Mut ex 19	4	1	/	2	0	8
Mut ex 21	1	2	1	2	3	0

- 2012 : 89 % (40/45) ont obtenu 20/20 ; 0 erreur
- 2013 : 64 % (29/45) ont obtenu 20/20 ; 3 laboratoires > 1 erreur
- faux négatifs : 15/449 (3,3 %) : 12 pour l'exon 18

Figure 1 : Résultats du génotypage d'EGFR dans le cancer du poumon.

Les recommandations découlant de cette étude ont permis de ramener le taux d'échec de l'analyse de 19 % à aujourd'hui 4-5 % (données INCa 2011). Le programme ERMETIC2 a évalué les techniques alternatives au séquençage pour la recherche de ces mutations⁽⁶⁾. Il a d'abord été rapporté les sensibilités des différentes techniques alternatives étudiées sur des lignées de cancers bronchiques mutées diluées anonymisées. La meilleure détection a été obtenue par amplification spécifique d'allèle. À côté de cette meilleure sensibilité, il a aussi été démontré que l'on rattrape avec les techniques alternatives des échantillons non analysables en séquençage. L'analyse de la cohorte prospective ERMETIC incluant 421 patients tous traités avec EGFR-TKI pour la détection des mutations EGFR et KRAS par les techniques alternatives les plus sensibles fait apparaître un taux comparable de mutations EGFR mais double pour les mutations KRAS.

Quels patients, quelles mutations ?

Les taux de mutations de l'EGFR retrouvées dans les populations sont variables à travers le monde, car ils dépendent des cohortes analysées, notamment selon l'origine ethnique et le tabagisme. En France, le projet Biomarqueurs France (IFCT/INCa) a analysé les résultats de recherche de biomarqueurs de 18 679 patients porteurs d'un cancer bronchique non à petites cellules sur l'année 2012, et met en évidence un taux de mutations de l'EGFR de 11 %⁽⁷⁾.

Les mutations rares de l'EGFR sont étudiées par une autre étude française rétrospective sur les mutations de l'EGFR des exons 18 et 20 : elle a montré que ces mutations représentent jusqu'à 10 % des mutations de l'EGFR, et seraient respectivement plus fréquentes chez les fumeurs et les non-fumeurs⁽⁸⁾. Ainsi, une mutation de l'exon 20 chez un fumeur serait de particulièrement mauvais pronostic. Parmi les insertions de l'exon 20 de l'EGFR, celles dites proximales (AA < 767) pourraient être associées à une sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) de l'EGFR, contrairement aux insertions distales. Il est proposé de séparer les mutations de l'EGFR dites classiques (exons 19, 21), des mutations dites rares (exons 18, 20), des mutations très rares et complexes (exons 18 et 20 associées, ou associées à une mutation d'un autre exon 19 ou 21). Parmi les événements mutationnels rares, il a également été rapporté la possibilité de mettre en évidence lors du diagnostic initial la mutation T790M de l'EGFR (exon 20), connue habituellement pour être présente lors de 50 % des résistances secondaires aux ITK-EGFR, et responsable d'une absence de réponse au traitement et d'une aggravation clinique⁽⁹⁾. Parmi les mutations rares de l'EGFR, il existe aussi de manière beaucoup plus anecdotique des mutations germinales de l'EGFR (par exemple au niveau de l'exon 21) et qui ne semblent pas être associées à une réponse aux ITK-EGFR⁽¹⁰⁾.

Les résistances secondaires aux ITK-EGFR.

Dans 50 % des cas, une mutation de l'exon 20, la mutation T790M, est mise en évidence, associée à la mutation de sensibilité initiale⁽¹¹⁾. Elle favoriserait une progression plutôt indolente du clone tumoral. Cette mutation T790M peut être associée ou non à d'autres mécanismes de résistance secondaire. Si trois autres mutations de l'EGFR de résistance secondaires aux ITK-EGFR ont aussi été

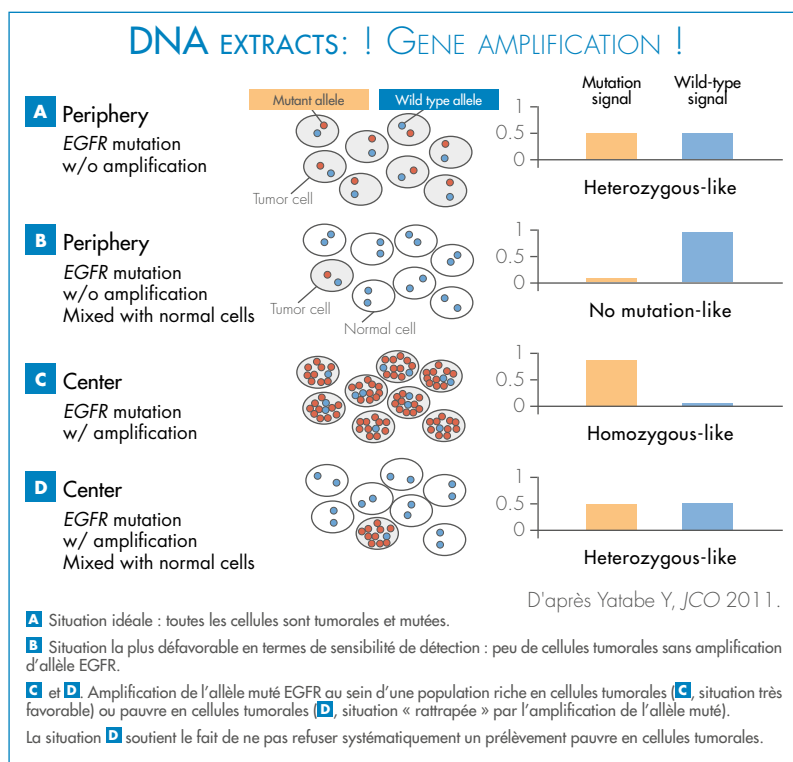


Figure 2 : DNA extracts ! Gene amplification.

décrites (L747S, D761Y, T854A), cette situation est bien différente des résistances secondaires d'ALK qui sont corrélées à des mutations du gène cible beaucoup plus nombreuses⁽¹²⁾. D'un autre côté, des mutations de l'EGFR ont été rapportées comme mécanisme de résistance primaire, mais surtout secondaires aux ITK-ALK chez les patients présentant une translocation ALK^(13,14).

Les perspectives

La recherche de mutations par biopsies liquides telles que l'ADN circulant (cfDNA) en cas de problème de prélèvement tissulaire peut être proposée et a été à la base d'une extension d'AMM pour le gefitinib dans les cancers bronchiques non à petites cellules (avis de l'EMA, septembre 2014)⁽¹⁵⁾. Cette méthode permet également un suivi de l'efficacité du traitement et la détection précoce des progressions. L'étude IFUM de phase IV, prospective, multicentrique, de détection des mutations de l'EGFR dans le plasma avec le kit TheraScreen®, met en évidence une sensibilité de 65,7 % et une spécificité proche de 99,8 %⁽¹⁶⁾. Une méta-analyse retrouve des valeurs respectives de sensibilité et de spécificité de 69 % et 92 %, confirmant que la technique de recherche sur l'ADN circulant est une technique sensible très spécifique⁽¹⁷⁾. Le suivi des mutations de l'EGFR dans l'ADN circulant pourra être proposé comme une aide à la décision thérapeutique : si la mutation activatrice reste présente, cela équivaldrait à une absence de réponse au traitement. Si par contre, la mutation de l'EGFR se situe en dessous du seuil de détection, cela confirmerait la réponse. En cas de re-détection de la mutation, il faudrait s'orienter vers une alternative thérapeutique.

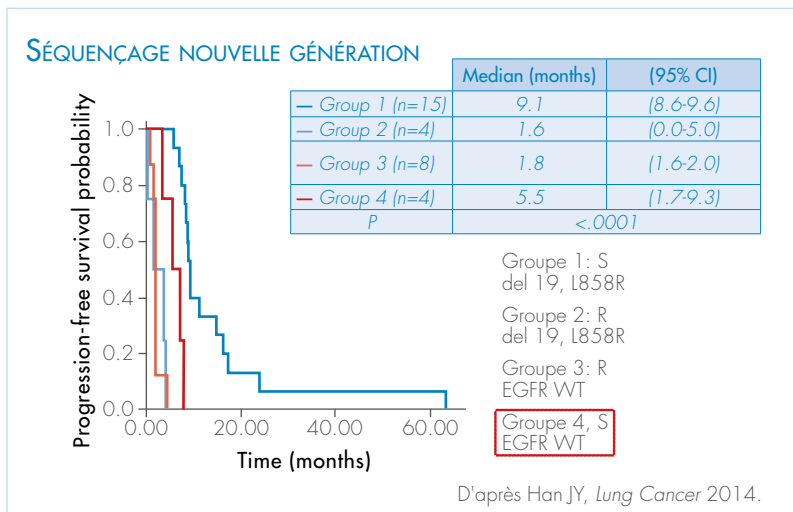


Figure 3 : Séquençage nouvelle génération.

Le séquençage nouvelle génération va assez rapidement être disponible pour les analyses de routine. Il permettra de tester plusieurs échantillons à la fois, et avec plusieurs dizaines de gènes séquencés dans

le même *run*. Cette technique a permis par exemple d'identifier des sous-groupes pronostiques (survie jusqu'à progression) de patients porteurs de cancers bronchiques non à petites cellules traités par ITK-EGFR (figure 3)⁽¹⁸⁾. Cette technique NGS a mis aussi en évidence de nouvelles mutations comme les micro délétions de l'exon 19 de l'EGFR dont l'interprétation en termes de valeur prédictive n'est pas encore clairement identifiée⁽¹⁹⁾.

Conclusion

En France, le taux de mutations de l'EGFR est de 11 %, avec une valeur prédictive bien déterminée pour la grande majorité de ces mutations. Elles peuvent être séparées en mutations, fréquentes ou communes et en mutations plus rares et parfois complexes. Les nouvelles technologies de biologie moléculaire permettent de rechercher les mutations de l'EGFR sur des échantillons non-tissulaires tels que les biopsies liquides comme d'ADN plasmatique circulant. Elles vont également permettre l'identification de nouvelles mutations dont la valeur prédictive reste à déterminer, de même que leur plus grande sensibilité, ce qui pose le problème du seuil de détection.

1. Institut National du Cancer, ed. *Synthèse de l'activité des plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers en 2012, en vue d'optimiser leur évolution*. Collection Bilans d'activité et d'évaluation, Boulogne-Billancourt, France: l'INCa, 2014.
2. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
3. Yatabe Y, Matsuo K, Mitsudomi T. *Heterogeneous distribution of EGFR mutations is extremely rare in lung adenocarcinoma*. *J Clin Oncol*. 2011 Aug 1;29(22):2972-7.
4. Beau-Faller M, Degeorges A, Rolland E et al. *Cross-validation study for epidermal growth factor receptor and KRAS mutation detection in 74 blinded non-small cell lung carcinoma samples: a total of 5550 exons sequenced by 15 molecular French laboratories (evaluation of the EGFR mutation status for the administration of EGFR-TKIs in non-small cell lung carcinoma [ERMETIC] project-part 1)*. *J Thorac Oncol*. 2011 Jun;6(6):1006-15.
5. Cadranet J, Mauguén A, Faller M et al. *Impact of systematic EGFR and KRAS mutation evaluation on progression-free survival and overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer treated by erlotinib in a French prospective cohort (ERMETIC project-part 2)*. *J Thorac Oncol*. 2012 Oct;7(10):1490-502.
6. Beau-Faller M, Blons H, Domerg C et al. *A multicenter blinded study evaluating EGFR and KRAS mutation testing methods in the clinical non-small cell lung cancer setting-IFCT/ERMETIC2 Project Part 1: Comparison of testing methods in 20 French molecular genetic National Cancer Institute platforms*. *J Mol Diagn*. 2014 Jan;16(1):45-55.
7. Barlesi F, Mazieres J, Merlio JP et al. *Routine molecular profiling of cancer: results of a one-year nationwide program of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT) for non-small cell lung cancer (NSCLC) patients*. *ASCO* 2013.
8. Beau-Faller M, Prim N, Ruppert AM et al. *Rare EGFR exon 18 and exon 20 mutations in non-small-cell lung cancer on 10 117 patients: a multicentre observational study by the French ERMETIC-IFCT network*. *Ann Oncol*. 2014 Jan;25(1):126-31.
9. Schaller A, Beau-Faller M, Mennecier B et al. *Lung adenocarcinoma with pulmonary military metastases and complex somatic heterozygous mutation*. *Case Report Oncol* 2014; 7:769-773.
10. Prim N, Legrain M, Guerin E et al. *Germ-line exon 21 EGFR mutations, V843I and P848L, in nonsmall cell lung cancer patients*. *Eur Respir Rev*. 2014 Sep;23(133):390-2.
11. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D et al. *Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors*. *Sci Transl Med*. 2011 Mar 23;3(75):75ra26.
12. Shaw AT, Engelman JA. *ALK in lung cancer: past, present, and future*. *J Clin Oncol*. 2013 Mar 10;31(8):1105-11.
13. Karachaliou N, Rosell R. *Systemic treatment in EGFR-ALK NSCLC patients: second line therapy and beyond*. *Cancer Biol Med*. 2014 Sep;11(3):173-81.
14. Yang JJ, Zhang XC, Su J et al. *Lung cancers with concomitant EGFR mutations and ALK rearrangements: diverse responses to EGFR-TKI and crizotinib in relation to diverse receptors phosphorylation*. *Clin Cancer Res*. 2014 Mar 1;20(5):1383-92.
15. Diaz LA Jr, Bardelli A. *Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA*. *J Clin Oncol*. 2014 Feb 20;32(6):579-86.
16. Douillard JY, Ostoros G, Cobo M et al. *Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status*. *J Thorac Oncol*. 2014 Sep;9(9):1345-53.
17. Luo J, Shen L, Zheng D. *Diagnostic value of circulating free DNA for the detection of EGFR mutation status in NSCLC: a systematic review and meta-analysis*. *Sci Rep*. 2014 Sep 9;4:6269.
18. Han JY, Kim SH, Lee YS et al. *Comparison of targeted next-generation sequencing with conventional sequencing for predicting the responsiveness to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) therapy in never-smokers with lung adenocarcinoma*. *Lung Cancer*. 2014 Aug;85(2):161-7.
19. Marchetti A, Del Gramastro M, Filice G et al. *Complex mutations & subpopulations of deletions at exon 19 of EGFR in NSCLC revealed by next generation sequencing: potential clinical implications*. *PLoS One*. 2012;7(7):e42164.