



# Marqueurs moléculaires prédictifs de réponse aux thérapies ciblées dans les cancers digestifs

Géraldine Perkins

## ► To cite this version:

Géraldine Perkins. Marqueurs moléculaires prédictifs de réponse aux thérapies ciblées dans les cancers digestifs. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. <NNT : 2012PA05P656>. <tel-00829655>

**HAL Id: tel-00829655**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00829655>**

Submitted on 3 Jun 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THÈSE**

Présentée devant  
L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Ecole Doctorale du Médicament

Pour l'obtention du diplôme de DOCTORAT

**MARQUEURS MOLECULAIRES PREDICTIFS DE  
REPONSE AUX THERAPIES CIBLEES DANS LES  
CANCERS DIGESTIFS**

Présentée et soutenue publiquement le 28 novembre 2012 par

**Géraldine PERKINS**

Jury :

|                              |                    |
|------------------------------|--------------------|
| Monsieur DUCREUX Michel      | Rapporteur         |
| Monsieur MILANO Gérard       | Rapporteur         |
| Monsieur APARICIO Thomas     | Examineur          |
| Monsieur TAIEB Julien        | Examineur          |
| Monsieur MITRY Emmanuel      | Examineur          |
| Monsieur LAURENT-PUIG Pierre | Directeur de thèse |

Le travail que je présente dans ce mémoire a pu être effectué grâce à l'aide, les conseils et le soutien de nombreuses personnes, que je tiens à remercier.

Mes remerciements vont tout d'abord au **Pr Pierre Laurent-Puig**, directeur du laboratoire INSERM U775, qui m'a fait découvrir la recherche scientifique, m'a conseillé et soutenu tout au long de mon parcours. Je suis très heureuse de pouvoir lui apporter ici le témoignage de mon profond respect.

Je remercie Monsieur le **Professeur Michel Ducreux** d'avoir accepté de juger cette thèse en tant que rapporteur. Ses remarques précises et pertinentes apportent un éclairage nouveau à ce travail.

Je remercie Monsieur le **Docteur Gérard Milano** d'avoir accepté de juger cette thèse en tant que rapporteur. La rigueur scientifique et la pertinence des ses commentaires m'ont marqué.

Je remercie Monsieur le **Professeur Thomas Aparicio** qui me fait l'honneur d'examiner ce travail et de participer à ce jury.

Je remercie Monsieur le **Professeur Emmanuel Mitry**, pour m'avoir initiée à l'oncologie digestive, et pour me fait le plaisir de participer à ce jury.

Je remercie Monsieur le **Professeur Julien Taïeb**, qui pour la seconde fois, me fait l'honneur de siéger à mon jury de thèse.

Je remercie **Monsieur le Docteur Johann de Bono**, qui m'a accueilli dans son laboratoire au Institute of Cancer Research, m'a confié un projet passionnant, tout en m'offrant les conditions scientifiques et matérielles pour mener à bien ce travail.

Je tiens tout particulièrement à remercier les membres du laboratoire U775, et notamment Delphine Le Corre, Claire Mulot, Karine Pallier, Magali Nacfer, Audrey Didelot, Marie-Anne Lorient, Jean-Pierre Flinois, Monique Diry, Philippe Beaune, Hélène Blons et Isabelle de Waziers, ainsi que l'ensemble du laboratoire du Cancer Biomarker Group, et plus particulièrement Tim Yap, Ruth Riisnaes, Susana Miranda, Jane Goodall, Anna Wingate, Ai Lim, Shahneen Sandhu, et les filles du TMO. Leur aide et leur bonne humeur ont grandement facilité mon travail.

Je tiens à remercier particulièrement le **Docteur Jeremy Clark**, dont la vivacité d'esprit et le génie pratique m'ont impressionnés.

Ce travail a été réalisé avec l'aide, à différents moments de mon parcours, du laboratoire Merck et de l'Institut National du Cancer.

Je remercie vivement tous mes amis, et plus particulièrement Marie et Sébastien, Miriam, Morgan, pour leur accueil pendant notre exil, ainsi que les Frenchies de Sutton, Elsa et Guillaume, qui nous ont fait sentir comme à la maison. Et merci à Vanessa pour son oreille compréhensive et sa bonne humeur.

Je remercie les Massard, pour leur soutien pendant ces deux années outre-Manche, et encore maintenant.

Enfin, je dédie ce travail à **Christophe et Charlotte**, mes deux amours. Mes plus tendres pensées sont pour eux.

## Table des matières

|                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INTRODUCTION</b> .....                                                                             | <b>10</b> |
| <br>                                                                                                  |           |
| <b>PARTIE I : LES ALTERATIONS MOLECULAIRES DANS LE CANCER<br/>COLORECTAL</b> .....                    | <b>13</b> |
| <b>I. .... Les mécanismes de carcinogenese dans le cancer colorectal</b>                              | <b>14</b> |
| I.1 Le phénotype CIN .....                                                                            | 14        |
| I.2 Le phénotype MSI .....                                                                            | 15        |
| I.3 Le phénotype CIMP.....                                                                            | 16        |
| <b>II. .... Les voies de signalisations de l'EGFR dans le cancer colorectal</b>                       | <b>17</b> |
| II.1 La voie RAS/MAPK .....                                                                           | 19        |
| II.2 La voie PI3K/AKT .....                                                                           | 21        |
| II.3 Les autres voies de signalisation activées par le récepteur de l'EGFR .....                      | 23        |
| <b>III. .... Les autres voies de signalisation : APC, p53 et TGFbeta</b>                              | <b>24</b> |
| <br>                                                                                                  |           |
| <b>PARTIE II: FACTEURS PREDICTIFS DE REPONSE AUX ANTICORPS ANTI-<br/>EGFR : AU-DELA DE KRAS</b> ..... | <b>27</b> |
| <b>I. .... Contexte de l'étude</b>                                                                    | <b>28</b> |
| I.1 Thérapeutiques ciblant l'EGFR développées dans le cancer du colon .....                           | 28        |
| I.2 Facteurs prédictifs de réponse aux anti-EGFR dans le cancer du colon .....                        | 35        |
| <b>II. .... Objectifs de l'étude</b>                                                                  | <b>38</b> |
| II.1 Hypothèse du travail.....                                                                        | 38        |
| II.1 Description de la technique du Bioplex Protein Array .....                                       | 40        |
| <b>III. .... Résultats</b>                                                                            | <b>43</b> |
| <b>IV. .... Discussion</b>                                                                            | <b>44</b> |
| IV.1 Les facteurs prédictifs de réponse au cetuximab : KRAS et au delà de<br>KRAS .....               | 44        |
| IV.1.1 Mutation KRAS et résistance aux anti-EGFR .....                                                | 44        |
| IV.2 Activation en aval de KRAS : les voies MAPK et PI3K .....                                        | 48        |
| IV.2 Autres facteurs de réponse au cetuximab .....                                                    | 55        |
| IV.2.1. Clinique : toxicité cutanée .....                                                             | 55        |
| IV.2.2 L'EGFR : surexpression, amplification, mutation .....                                          | 57        |
| IV.2.3 Amphiréguline et épîréguline .....                                                             | 59        |
| IV.2.4 Facteurs immunologiques et réponse au cetuximab : ADCC .....                                   | 60        |
| IV.3 Vers de nouvelles thérapeutiques : au delà du cetuximab .....                                    | 61        |

|                                                                          |                                |
|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| <b>PARTIE III: LA RECHERCHE DE MUTATIONS DANS L'ADN CIRCULANT .....</b>  | <b>65</b>                      |
| <b>I. ....</b>                                                           | <b>Contexte de l'étude 66</b>  |
| I.1 L'ADN circulant.....                                                 | 66                             |
| I.2 L'ADN circulant : source d'ADN tumoral .....                         | 68                             |
| <b>II. ....</b>                                                          | <b>Objectifs de l'étude 70</b> |
| II.1 Hypothèse de travail.....                                           | 70                             |
| II.2 La technique du Sequenom .....                                      | 71                             |
| <b>III. ....</b>                                                         | <b>Résultats 75</b>            |
| <b>IV. ....</b>                                                          | <b>Discussion 76</b>           |
| IV.1 L'ADN circulant : biopsie « liquide » dans le cancer du colon ..... | 77                             |
| IV.2 Les principales méthodes d'étude de l'ADN circulant .....           | 79                             |
| IV.3 Perspectives de l'utilisation de l'ADN circulant .....              | 85                             |
| <br><b>CONCLUSION .....</b>                                              | <br><b>92</b>                  |

## **LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES**

- Tableau 1** tableau récapitulatif des principales études cetuximab et Panitumumab
- Tableau 2** Réponse au cetuximab en fonction du statut mutationnel *KRAS* dans l'étude Lièvre et al., 2008
- Figure 1** Voies de signalisation activées par l'EGFR
- Figure 2** La protéine Ras
- Figure 3** Schéma simplifié récapitulatif des voies de signalisation de l'EGFR illustrant les différents biomarqueurs étudié dans le travail de thèse
- Figure 4** Schéma illustrant la technique du Bioplex Protein Array
- Figure 5** Schéma de la réaction iPlex

## LISTE DES ABBREVIATIONS

|          |                                                   |
|----------|---------------------------------------------------|
| ACE      | Antigène Carcino-Embryonnaire                     |
| ADCC     | Antibody Dependant Cell mediated Cytotoxicity     |
| ADNcir   | ADN circulant                                     |
| AMM      | Autorisation de Mise sur le Marché                |
| AREG     | AmphiREGuline                                     |
| ARMS     | Amplification Refractory Mutation System          |
| BEAMing  | Beads Emulsions Amplifications Magnetics          |
| CBNPC    | Cancer Bronchique Non Petites Cellules            |
| CCR      | Cancer Colorectal                                 |
| CIMP     | CpG Island Methylator Phenotype                   |
| CIN      | Chromosomal Instability                           |
| DCE      | Denaturing Capillary Electrophoresis              |
| dHPLC    | Denaturing High Performance Liquid Chromatography |
| DNMT     | ADN methyltransferase                             |
| dNTP     | DéoxyNucléotides                                  |
| EGFR     | Epidermal Growth Factor Receptor                  |
| EIF4E    | Eukaryotic Translation-Initiation Factor 4        |
| EREG     | EpiREGuline                                       |
| FDA      | Food Drug Administration                          |
| GEF      | Guanine nucleotide-Exchange Factor                |
| GSK3beta | Glycogen Synthase Kinase-3                        |
| HER      | Human Epidermal Receptor                          |
| HR       | Hazard Ratio                                      |
| IHC      | ImmunoHistoChimie                                 |
| mAb      | Monoclonal AntiBody                               |
| MAPK     | Mitogen-Activated Protein Kinase                  |
| MMR      | Mismatch Repair                                   |
| MPK      | MAPK phosphatase                                  |
| MSI      | MicroSatellite Instability                        |
| mTOR     | Mammalian Target Of Rapamycine                    |
| OR       | Odds Ratio                                        |
| PAF      | Polypose Adénomateuse Familiale                   |
| PCR      | Polymerase Chain Reaction                         |
| PI3K     | Phosphatidyl Inositol 3 Kinase                    |
| PIP3     | PhosphatidylInositol Triphosphate                 |
| PLC      | Phospholipase C                                   |
| PNA      | Peptid Nucleic Acid                               |
| PTB      | Phosphotyrosine Binding                           |
| PTEN     | Phosphatases with Tensin Homology                 |
| RFLP     | Restriction Frame Lengh Polymorphism              |
| SAP      | Shrimp Alkaline Phosphatase                       |
| SG       | Survie Globale                                    |
| SH2      | Src Homology 2                                    |



|              |                                                    |
|--------------|----------------------------------------------------|
| SOS          | Son Of Sevenless                                   |
| SSP          | Survie Sans Progression                            |
| SSP          | Survie Sans Progression                            |
| SSR          | Survie Sans Récidive                               |
| STAT         | Signal Transducers and Activators of Transcription |
| TGF $\alpha$ | Transforming Growth Factor Alpha                   |
| TKI          | Tyrosin Kinase Inhibitor                           |
| TMC          | Thérapie Moléculaire Ciblée                        |
| VEGF         | Vascular Endothelial Growth Factor                 |

## LISTE DES PUBLICATIONS

Les travaux de thèse ont donné lieu aux publications suivantes :

- Perkins G, Lièvre A, Ramacci C, Méatchi T, de Reynies A, Emile JF, Boige V, Tomasic G, Bachet JB, Bibeau F, Bouché O, Penault-Llorca F, Merlin JL, Laurent-Puig P. (2010). "Additional value of EGFR downstream signaling phosphoprotein expression to KRAS status for response to anti-EGFR antibodies in colorectal cancer." Int J Cancer **127**(6): 1321-31. (page 43)
- Perkins G, Yap TA, Pope L, Cassidy AM, Dukes JP, Riisnaes R, Massard C, Cassier PA, Miranda S, Clark J, Denholm KA, Thway K, Gonzalez De Castro D, Attard G, Molife LR, Kaye SB, Banerji U, de Bono JS. (2012). Multi-purpose utility of circulating plasma DNA testing in patients with advanced cancers. PLoS One. 2012;7(11):e47020. doi: 10.1371/journal.pone.0047020. Epub 2012 Nov 7. (page 75)

# Introduction

Les traitements des cancers reposent sur l'utilisation de produits de chimiothérapie, qui ont permis l'amélioration de la survie chez de nombreux patients et dans de multiples localisations tumorales.

Les thérapies moléculaires ciblées (TMC) ont révolutionné l'approche de la prise en charge des cancers au stade métastatique, mais ont aussi modifié radicalement la compréhension de la biologie des cancers. Les 4 principaux types de cancers responsables de la majorité des décès par cancer sont les cancers du poumon, du sein, de la prostate et du colon.

En France, le cancer colorectal (CCR) est la troisième cause de décès par cancer chez les hommes et la deuxième cause chez les femmes, avec un nombre de décès par an d'environ 16000 en 2005 (Hill et al., 2008). Le traitement du CCR métastatique repose sur la chimiothérapie de type fluoropyrimidines en association avec l'oxaliplatine ou l'irinotecan, ce qui a permis d'améliorer considérablement le pronostic du CCR depuis une trentaine d'année.

L'arrivée des TMC (cetuximab, panitumumab, bevacizumab) dans le traitement des CCR au stade métastatique a permis d'améliorer encore la survie des patients et d'obtenir une survie médiane de 24 mois, en association avec les nouvelles chimiothérapies (Hurwitz et al., 2004 ; Hochster et al., 2008). Les cibles des TMC sont impliquées dans les processus de transformation néoplasique de la cellule, comme c'est le cas avec les anticorps anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), soit dans les mécanismes de néoangiogenèse tumorale, comme les anticorps anti-VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).

Compte tenu du nombre croissant de combinaisons efficaces dans le traitement du CCR, complexifiant le choix du traitement, il est important de développer des outils d'aide à la décision pour le clinicien, afin de déterminer les facteurs prédictifs de la réponse aux traitements et de donner ainsi la thérapeutique la plus efficace et la moins toxique à chacun de ces malades (Schrag et al., 2004).

Mon travail de thèse s'est donc intéressé à l'étude des marqueurs prédictifs des TMC dans les cancers digestifs.

Une première partie s'est intéressée aux voies de signalisation en aval de l'EGFR, afin de savoir si elles pouvaient conditionner la réponse au cetuximab dans le CCR. Pour ce faire, le taux d'expression tumorale des phosphoprotéines de signalisation en aval de l'EGFR (p-MEK, p-ERK1/2, p-AKT, p-GSK3b, p-P70S6K) a été analysé par Bioplex® Phosphoprotein Array chez 42 patients avec un CCR métastatique, traités par anti-EGFR. Ainsi, certaines de ces phosphoprotéines pourraient pronostiquer la réponse et la survie sans progression dans les CCR traités par anti-EGFR, indépendamment du statut *KRAS*.

Une deuxième partie de ma thèse s'est déroulée dans le laboratoire du Dr Johann de Bono à Sutton en Grande-Bretagne, et s'est focalisée sur l'ADN circulant (ADNcir) pour la caractérisation moléculaire des tumeurs avancées. Ainsi, la faisabilité, la sensibilité et la spécificité d'une technique de spectrométrie de masse (Sequenom®) ont été étudiées pour la détection de mutations (238 mutations parmi 19 oncogènes) à partir du tissu tumoral et de l'ADNcir de 105 patients ayant un cancer avancé. L'ADNcir pourrait être un substitut ou un complément du tissu tumoral pour l'analyse génétique des tumeurs, et servir de « biopsie liquide ».

# **Partie I**

## **LES ALTERATIONS MOLECULAIRES DANS LE CANCER COLORECTAL**

## **I. Les mécanismes de carcinogenèse dans le cancer colorectal**

Les anomalies génétiques sont fréquentes dans de nombreux types de cancer. Celles-ci sont impliquées dans la carcinogenèse, dans la progression métastatique, mais peuvent aussi être utilisées comme cibles thérapeutiques (MacConaill et al., 2010). Le CCR est une bonne illustration du développement des nouvelles thérapies moléculaires ciblées dans les cancers métastatiques. L'histoire naturelle du cancer colique est fortement corrélée à la présence d'altérations génétiques qui interviennent au cours de la progression de la maladie depuis le stade d'adénome colique, au stade de carcinome puis de maladie métastatique (Rajagopalan et al., 2003).

Trois mécanismes de carcinogenèse ont été identifiés dans le cancer colorectal, se traduisant par 3 phénotypes tumoraux différents mais impliquant finalement des voies de signalisation identiques. Les 3 phénotypes tumoraux sont le phénotype CIN (chromosomal instability), le phénotype MSI (microsatellite instability) et le phénotype CIMP (CpG island methylator) (Markowitz et al., 2009 ; Laurent-Puig et al., 2010).

### **I.1 Le phénotype CIN**

Le phénotype CIN correspond à 80% des CCR sporadiques. Il se traduit par des pertes alléliques localisées sur le bras court des chromosomes 17 et 8 et sur le bras long des chromosomes 18, 5, et 22. Ces pertes, associées à des mutations fréquentes dans les mêmes régions, entraînent une inactivation biallélique de gènes suppresseurs de tumeur tels que le gène *APC*, localisé sur le bras long du

chromosome 5, le gène *TP53* localisé sur le bras court du chromosome 17, et le gène *SMAD4* sur le bras long du chromosome 18. Dans la polypose adénomateuse familiale (PAF), il existe une mutation constitutionnelle du gène *APC*. L'origine de cette instabilité chromosomique reste discutée, une des hypothèses étant la survenue de mutations du gène *APC* qui favoriserait les anomalies de ségrégation chromosomique (Fodde et al., 2001), L'inactivation du gène *TP53* a été elle aussi mise en évidence.

## **I.2 Le phénotype MSI**

Le phénotype MSI est caractérisé par une instabilité des locus microsatellites secondaire à un défaut de réparation des mésappariements de l'ADN ou système MMR (mismatch repair). Les tumeurs MSI représentent 15 % des cancers colorectaux (Ribic et al., 2003). Dans le cadre des CCR sporadiques, la cause de ce phénotype est une hyperméthylation du gène *hMLH1*, alors que dans le syndrome de Lynch, l'altération du système MMR est secondaire à une mutation inactivatrice constitutive d'un des gènes suivants : *hMSH2*, *hMLH1*, *hMSH6* et *PMS2*.

Le diagnostic de tumeur MSI+ est obtenu par une analyse par PCR étudiant le nombre de répétitions de plusieurs séquences microsatellites, en recherchant une augmentation ou une diminution par une analyse comparative entre l'ADN du tissu tumoral et du tissu sain adjacent. Le statut MSI peut être réalisé par la recherche de perte d'expression des protéines du système MMR en immunohistochimie. Cette approche est surtout utilisée en cas de suspicion de syndrome de Lynch afin d'orienter la recherche de mutation du gène codant pour la protéine éteinte en IHC.



Les tumeurs MSI+ dans un cadre sporadique sont situées très préférentiellement en amont de l'angle splénique. Ce déficit du système de réparation MMR entraîne une accumulation de mutations secondaires au niveau de ces séquences répétées codantes d'un certain nombre de gènes. En particulier, il a été mis en évidence la présence d'insertion ou de délétion conduisant à des décalages du cadre de lecture dans des gènes impliqués dans des voies de contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la réparation de l'ADN, tels que TGFR2, BAX et les facteurs de transcription TCF-4 et E2F4 (Duval et al., 2002)

### **I.3 Le phénotype CIMP**

Enfin, le dernier phénotype CIMP est de découverte plus récente. Il correspond à une hyperméthylation des cytosines des îlots CpG des régions promotrices des gènes entraînant une inactivation transcriptionnelle de gènes suppresseurs de tumeur, tel que le gène *p16INK4A* retrouvé hyperméthylé dans 26% des CCR dans une étude (Barault et al., 2008). La définition du phénotype CIMP+ ne se résume pas à l'hyperméthylation d'un seul gène, mais d'un groupe de gènes. Ainsi, dans le CCR, le nombre de gènes est compris entre 5 et 8 selon les études, et au moins la moitié de ces gènes doit être hyperméthylée pour parler de phénotype CIMP+ (Weisenberger et al., 2006 ; Ogino et al., 2007). Les enzymes responsables de la méthylation de l'ADN sont les ADN méthyltransférases (DNMT), dont des taux élevés ont été mis en évidence dans les cellules tumorales coliques (el-Deiry et al., 1991). La plus étudiée de ces enzymes est la DNMT-1, dont la surexpression semble entraîner la transformation néoplasique des cellules (Wu et al., 1993).

Comme vu précédemment, la région promotrice du gène hMLH1 peut être hyperméthylée dans le phénotype MSI+, correspondant aussi au double phénotype MSI+ et CIMP+. Ce double phénotype se rencontre donc dans les tumeurs MSI+ dans le cadre des CCR sporadiques, en opposition aux tumeurs MSI+ dans le cadre du syndrome de Lynch où il n'a pas été mis en évidence d'hyperméthylation de la région promotrice.

Parmi ces différents phénotypes de tumeur, des voies de signalisation intracellulaires sont activées, et peuvent être identiques. Parmi ces voies de signalisation, nous avons choisi de détailler la voie de transduction du signal du récepteur à l'EGF.

## **II Les voies de signalisations de l'EGFR dans le cancer colorectal**

Le récepteur à l'EGF (EGFR) ou HER-1 (Human Epidermal Receptor) est un récepteur trans-membranaire qui appartient à la famille des récepteurs ayant une activité tyrosine kinase incluant trois autres membres (HER-2, HER-3 et HER-4) (Yarden et al., 2001). Ce récepteur est surexprimé dans un grand nombre de tumeurs, notamment les cancers ORL, du sein, colorectal, pulmonaire, prostatique, rénal, ovarien, cérébral, pancréatique et de vessie. Cette surexpression semble liée à un mauvais pronostic et une diminution de survie (Nicholson et al., 2001 ; Kim et al., 2001). Ainsi, dans le CCR, l'expression de l'EGFR apparaît comme un facteur de mauvais pronostic. Dans un travail à partir de 62 tumeurs colorectales opérées, les tumeurs exprimant l'EGFR étaient associées à un stade plus avancé (27% des tumeurs EGFR négatives étaient parmi les tumeurs avec un stade 3 ou 4, contre 58% des tumeurs EGFR positives,  $p=0,03$ ), à un degré d'aneuploïdie plus important

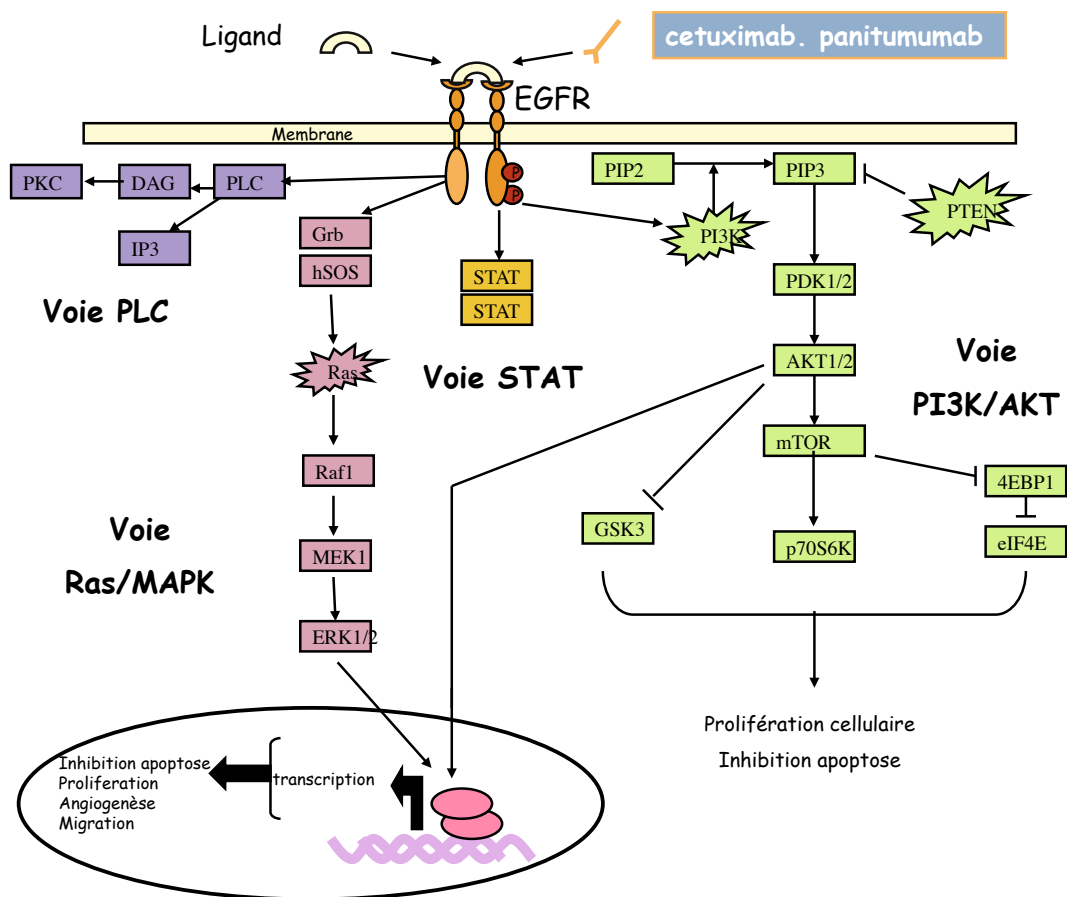
(48% des tumeurs EGFR négatives contre 82% des tumeurs EGFR positives,  $p=0,01$ ). Enfin, l'invasion lymphatique était plus fréquente dans les tumeurs EGFR positives ( $p=0,03$ ) (Hemming et al., 1992). Un score composite d'expression de l'EGFR, obtenu en associant le pourcentage de cellules positives avec l'intensité du marquage, permet de classer les tumeurs de 0 à 3+. La plus forte expression de l'EGFR était retrouvée au niveau des zones d'invasion profonde de la tumeur, et un score élevé dans cette zone était corrélé à une diminution de survie ( $p=0,03$ ) (Goldstein et al., 2001). Une autre équipe a repris ce score pour étudier une population de 150 patients atteints d'un CCR. La surexpression de l'EGFR était alors corrélée au stade tumoral, notamment le stade T3 (Spano et al., 2005).

L'EGFR se présente sous la forme de monomère et comprend 3 parties : une partie extracellulaire formée de domaines glycosylés servant à la liaison du ligand, une partie transmembranaire hydrophobe et une partie intra-cytoplasmique possédant un domaine tyrosine kinase et une région carboxyl-terminale comprenant trois domaines : le domaine juxta-membranaire servant de site de rétrocontrôle par la PKC (protéine kinase C) et ERK, puis le domaine tyrosine kinase, et enfin la région carboxyterminale contenant 5 motifs d'autophosphorylation (Wells et al., 1999). L'EGFR a 6 ligands connus : EGF, TGF $\alpha$  (transforming growth factor alpha), amphiréguline, betacelluline, heparin-binding EGF, et épiréguline. La fixation du ligand entraîne une dimérisation de l'EGFR sous forme d'un homo ou d'un hétéro-dimère en se liant aux autres membres de la famille HER, provoquant un changement de conformation permettant l'activation des domaines kinases et une transphosphorylation des résidus tyrosines dans la partie carboxyl-terminale. Les résidus tyrosines phosphorylés servent d'ancrage aux protéines contenant un

domaine SH2 (Src homology 2) ou un domaine PTB (phosphotyrosine binding), permettant l'initiation de voies de signalisation intracellulaire (Camp et al., 2005).

Les voies de signalisation intracellulaires résultantes de l'activation de l'EGFR sont la voie RAS/MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), la voie PI3K (Phosphatidyl Inositol 3 Kinase)/AKT, la voie STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) et la voie PLC (Phospholipase C) (Figure 1).

**Figure 1 : Voies de signalisation activées par l'EGFR (d'après Pr Laurent-Puig)**

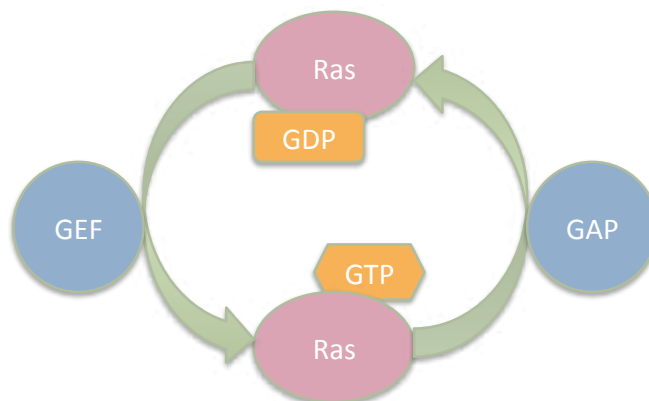


## II.1 La voie RAS/MAPK

La cascade RAS/MAPK est impliquée dans le contrôle des signaux de croissance, de survie cellulaire et d'invasion dans le cancer et est dérégulée dans 30% des cancers. La phosphorylation des résidus tyrosine de la région carboxyl-terminale de l'EGFR activé permet la fixation de la protéine adaptatrice GRB2 qui recrute SOS (Son Of Sevenless) à la membrane par son domaine SH3. SOS joue le rôle d'échangeur de guanidine (GEF ; Guanine nucleotide-Exchange Factor) qui permet l'échange du GDP par le GTP, et donc le passage de la forme RAS-GDP inactive à la forme RAS-GTP active (figure 2). RAS recrute et active RAF1, une sérine/thréonine kinase. Le gène codant pour raf1, *BRAF*, est muté dans 9 à 11% des cancers colorectaux et fréquemment dans les cas sporadiques avec instabilité microsatellite (Deng et al., 2004). RAF1 activé phosphoryle et active MEK (MAPK/ERK kinase), une tyrosine/thréonine kinase qui phosphoryle à son tour ERK1 et ERK2. Les protéines ERK sont des sérine/thréonine kinases qui, une fois phosphorylées, se dimérisent et sont transloquées dans le noyau, où elles phosphorylent la famille ETS des facteurs transcriptionnels (Scaltriti et al., 2006 ; Prior et al., 2012). Cette cascade RAS/MAPK aboutit à l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, la résistance à l'apoptose, l'angiogenèse, l'invasion et la diffusion métastatique. En effet, une étude sur culture cellulaire a mis en évidence que l'inhibition de ERK1/2 entraînait une diminution de l'expression de cycline D1, et que la cascade RAF/MEK1/ERK1/2 était suffisante pour induire l'expression de cycline D1, cette dernière étant une protéine régulatrice de la phase G1 du cycle cellulaire (Lavoie et al., 1996). Par ailleurs, sur des lignées cellulaires de CCR, une autre étude a mis en évidence que EGF augmentait l'expression endogène de MMP7 via les facteurs transcriptionnels PEA3, MMP7 étant une métalloprotéase impliquée dans la tumorigenèse intestinale précoce (Lynch et al.,

2004). Les MAPK phosphatases (MKP), régulent l'activité des MAPK en déphosphorylant à la fois les résidus thréonine et tyrosine, entraînant l'inactivation des MAPK. La plus connue des MKP est MKP1 ou DUSP1, qui est inducible et intra nucléaire (Keyse et al., 2008).

**Figure 2 : la protéine Ras**



## II.2 La voie PI3K/AKT

La voie PI3K/AKT peut être activée de différentes façons. La protéine PI3K est composée de deux sous-unités (p85 et p110). Une mutation de PIK3CA, gène codant pour la sous-unité catalytique p110 de PI3K, est rapportée dans 32% des cas (Samuels et al., 2004). La sous-unité p85 de PI3K peut se fixer directement par son domaine SH2 sur les résidus tyrosine phosphorylés du récepteur HER3 qui s'hétérodimérise avec l'EGFR activé, car les sites de reconnaissance de p85 sont absents de EGFR mais abondants sur HER3. La sous-unité p110 catalytique de PI3K, recrutée à la membrane, permet la génération de phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) à partir du phosphatidylinositol diphosphate (PIP2). PIP3 recrute à son tour PDK-1 et la serine/thréonine kinase AKT (ou PKB) à la membrane, où PDK-1 phosphoryle et active AKT (Scaltriti et al., 2006). AKT a pour rôles l'activation de la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (Bhaskar et al., 2007). Une autre voie d'activation de PI3K fait intervenir GRB2 qui se lie à GAB, qui elle-même recrute p85. Enfin, GRB2 peut activer RAS soit en se liant à SOS, et alors RAS peut activer p110 indépendamment de p85, soit au sein d'un complexe comprenant SOS, RAS et GAB, qui active PI3K. AKT active mTOR (mammalian target of rapamycin) qui active alors p70S6 kinase (p70S6K), impliquée dans la transformation oncogénique, et le facteur de traduction EIF4E (eukaryotic translation-initiation factor 4). Il existe des régulateurs négatifs de cette voie de signalisation comme la phosphatase PTEN (phosphatase with tensin homology). PTEN entraîne le passage de la forme PIP3 à PIP2. En s'opposant aux effets de l'activation de PI3K, PTEN agit comme un gène suppresseur de tumeur et des altérations somatiques inactivatrices de PTEN ont été observées dans les différents types tumoraux (Cully et al., 2006). Il existe un lien étroit entre la voie RAS/MAPK et la voie PI3K/AKT, par l'intermédiaire de RAS qui jouerait ainsi possiblement un rôle central dans les voies d'activation de l'EGFR (Mor

et al., 2006). Des travaux se sont intéressés à la valeur pronostique de l'activation des voies de signalisation de l'EGFR dans le CCR. Ainsi, dans une étude de tissu microarray, l'expression nucléaire de phospho-ERK était associée à la présence d'une invasion tumorale dans le groupe des CCR MMR (mismatch repair), et non en cas d'extinction de MLH1, une protéine de réparation de l'ADN. La surexpression cytoplasmique de phospho-AKT était plutôt corrélée avec un stade précoce de T et N du TNM, et l'absence d'invasion tumorale uniquement dans le groupe MLH1 négatif (Lugli et al., 2006).

GSK3beta (Glycogen Synthase Kinase-3) est une kinase régulée à la fois par la voie Wnt/betacatenine et la voie PI3K. Aucune mutation inactivatrice de GSK3beta n'a été rapportée dans les cancers humains. Dans la voie PI3K, AKT phosphoryle GSK-3beta sur le résidu sérine régulateur Ser9 et entraîne son inhibition. Dans la voie Wnt/betacatenine, le rôle de GSK3beta est de phosphoryler la betacatenine, ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome. L'inhibition de GSK3beta entraîne alors une accumulation de betacatenine, qui se transloque dans le noyau où elle interagit avec les facteurs de transcription TCF1, activant la transcription de gènes oncogènes tel que CDD1, MYC, C-JUN et VEGF (Jope et al., 2007). L'inhibition de GSK3beta semble jouer un rôle dans le processus métastatique, par l'absence de dégradation de SNAIL entraînant la diminution du niveau de cadherine E, protéine d'adhésion cellulaire. Ainsi, l'inhibition de GSK3beta favoriserait l'invasion cellulaire et l'apparition de métastases (Zhou et al., 2004). En plus de son implication dans les voies PI3K et Wnt, GSK3beta peut former un complexe nucléaire avec p53, favorisant l'expression des gènes induits par p53 et donc l'apoptose. L'inhibition de GSK3beta par phosphorylation entraîne donc une inhibition de l'apoptose (Watcharasit et al., 2002).



### **II.3 Les autres voies de signalisation activées par le récepteur de l'EGFR**

Les protéines STAT interagissent via leur domaine SH2 avec les tyrosines phosphorylées de l'EGFR activé, permettant leur dimérisation sous forme d'homo ou hétéro-dimères, leur translocation nucléaire et leur action en tant que facteur de transcription. La protéine STAT3 est active de façon constitutive dans de nombreux cancers.

La phospholipase C gamma (PLC $\gamma$ ) interagit directement avec l'EGFR activé et hydrolyse le PIP3 en IP3 (inositol 1,3,5-triphosphate) impliqué dans le signal calcium intracellulaire, et en 1,2-diacylglycerol, cofacteur de l'activation de la protéine kinase C (PKC) (Scaltriti et al., 2006).

Le gène *SRC* a été le premier oncogène identifié, et son activation n'est pas secondaire à une mutation ou une amplification, qui sont par ailleurs rares. La protéine SRC est activée directement par l'EGFR, et induit l'activation de la protéine FAK, qui participe à l'adhésion cellulaire et la transition épithélio-mésenchymateuse (Laurent-Puig et al., 2009b).

### **III Les autres voies de signalisation : APC, p53 et TGFbeta**

Le gène *APC* est un gène suppresseur de tumeur, qui est muté dans 60 à 80% des cancers coliques de phénotype CIN (Powell et al., 1992). L'altération constitutionnelle de ce gène est responsable de la polypose adénomateuse familiale (PAF). La protéine APC a un rôle suppresseur de tumeur, par un contrôle négatif sur le cycle cellulaire, par interaction avec la beta-caténine. La beta-caténine s'accumule

dans le cytoplasme des cellules après l'activation par l'oncogène WNT, forme un complexe protéique avec le facteur de transcription TCF4, qui est ensuite transloqué dans le noyau et favorise la transcription de gènes impliqués dans la prolifération tumorale (Goss et al., 2000). D'autres partenaires sont impliqués dans la régulation négative d'APC sur la beta-caténine, tel que l'enzyme GSK3beta. Une mutation activatrice de la beta-caténine, empêchant sa dégradation par le protéasome, est rapportée dans 50% des cancers coliques sans mutation APC (Sparks et al., 1998). D'autre part, une mutation activatrice du gène *TCF4* est aussi responsable de l'activation de la voie WNT (Duval et al., 1999). Enfin, il a été récemment décrit une interaction entre les voies PI3K/AKT et WNT/beta-caténine par le biais de FOXO3 (Forkhead Box O3), un suppresseur de tumeur induisant l'apoptose. FOXO3 est activé par AKT, ce qui le séquestre dans le cytoplasme. Les inhibiteurs de PI3K et AKT permettent à FOXO3 de rentrer dans le noyau, et réinstaurent ainsi son action apoptotique. Il a été montré qu'une accumulation de beta caténine entraînait une résistance à l'action proapoptotique de FOXO3. Et que dans cette situation, les inhibiteurs de PIK3 et AKT n'induisaient pas d'apoptose, et paradoxalement favorisaient un processus métastatique (Tenbaum et al., 2012).

La voie de signalisation TGF $\beta$  est impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire, de la différenciation, de la migration tumorale et de l'apoptose (Massague et al., 2000). Cette voie de signalisation entraîne l'activation de facteurs de transcriptions, les protéines SMAD2 et SMAD3. Leur phosphorylation permet aux protéines de migrer dans le noyau et de former un complexe avec SMAD4 (Fearon et al., 2011). TGF $\beta$  a ainsi un rôle suppresseur de tumeur par activation de gènes des cyclines entraînant l'arrêt du cycle cellulaire. Cette voie de signalisation est dérégulée dans 20 à 30 % des cancers colorectaux de phénotype CIN par mutations

inactivatrices des gènes *SMAD2* et *SMAD4* (Takayama et al., 2006). Alors que le gène du TGFbRII est trouvé muté dans 25% des CCR, il est inactivé dans 60 à 80% des cas du phénotype MSI (Parsons et al., 1995).

La protéine p53 joue le rôle de gardien du génome. Ces rôles sont le blocage du cycle cellulaire en cas de lésion de l'ADN, afin de permettre sa réparation, et l'induction de l'apoptose en cas de lésion trop graves. Les mutations germinales de *TP53* sont responsables du syndrome de Li Fraumeni, qui est associé à un risque accru de cancer à un âge précoce. Les mutations de *TP53* sont rapportées dans 50 à 75% des cas de cancer colorectal. Il s'agit essentiellement de mutations ponctuelles, et elles surviennent de façon tardive au cours de la carcinogénèse colique (Menendez et al., 2009). Les mutations surviennent essentiellement dans 5 régions « hotspot », et selon le codon muté, la localisation de la tumeur varie dans le colon (proximal ou distal). Par ailleurs, 200 polymorphismes de *TP53* ont été identifiés. Le plus étudié de ces polymorphisme est rs1042522, et est rapporté présent chez environ 60% des Afro-Américains et 30% des Américains Caucasiens. Les données concernant le rôle pronostique et prédictif des mutations et polymorphismes de *TP53* reste un sujet controversé. Une mutation de *TP53* semble être un facteur de mauvais pronostic. Le polymorphisme rs1042522 ou allèle Pro72 est aussi rapporté dans plusieurs études comme un facteur de mauvais pronostic. Concernant la réponse au traitement, il semble que les tumeurs avec *TP53* sauvage présentent une meilleure réponse à un chimiothérapie par 5FU. Ceci peut être expliqué en partie par le fait que le 5FU peut activer la p53 (Naccarati et al., 2012). Enfin, une meilleure réponse au cetuximab a été rapportée en cas de mutation de *TP53*, et en absence de mutation de *KRAS*. Dans ce travail étudiant 64 patients traités par cetuximab pour un CRC métastatique, une mutation de *TP53* était présente chez 64% des patients.

Dans le sous-groupe des patients sans mutation *KRAS*, une mutation de *TP53* était associée avec un meilleur contrôle de la maladie ( $p=0,008$ ) et une meilleure SSP (24 contre 12 semaines,  $p=0,0007$ ) (Oden-Gangloff et al., 2009).

## **Partie II**

# **FACTEURS PREDICTIFS DE REPONSE AUX ANTICORPS ANTI- EGFR : AU-DELA DE KRAS**

## **I Contexte de l'étude**

Des médicaments ciblant l'EGFR ont été développés dans le traitement du cancer, et en particulier les CCR depuis une dizaine d'années. Comme nous l'avons vu, ce récepteur de l'EGFR semble jouer un rôle important dans la pathogénie du CCR. Il est exprimé dans les stades avancés de CCR, entre 72 et 82% des cas (Goldstein et al., 2001 ; Saltz et al., 2004 ; Cunningham et al., 2004), et son expression en IHC (immunohistochimie) semble associée à une faible survie et un risque accru de métastases (Hemming et al., 1992). Il existe différentes approches pour inhiber l'EGFR : sa neutralisation par des anticorps monoclonaux (mAb) dirigés contre la partie extra-membranaire du récepteur (cetuximab, panitumumab), ou les inhibiteurs du domaine tyrosine kinase du récepteur (TKI) (Gefitinib et Erlotinib). Les TKI sont de petites molécules entrant en compétition avec l'ATP dans le domaine tyrosine kinase du récepteur, au niveau du site de liaison de l'ATP, empêchant la phosphorylation à ce niveau et donc la transduction du signal. Au contraire des anticorps monoclonaux, les TKI n'entraînent pas l'internalisation du récepteur (Arteaga et al., 2003).

### **I.1 Thérapeutiques ciblant l'EGFR développées dans le cancer du colon**

Plusieurs mAb ciblant l'EGFR existent dans le traitement du CCR (cetuximab, panitumumab) (Gibson et al., 2006). Actuellement, le cetuximab et plus récemment le panitumumab ont une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le traitement du cancer colorectal métastatique. Leur liaison à la partie extracellulaire du récepteur de l'EGF entraîne une inhibition compétitive, empêchant la dimérisation

du récepteur et ainsi l'activation des domaines tyrosines kinases. Par la suite, la liaison de l'anticorps entraîne l'internalisation du récepteur et une diminution de son expression membranaire (Camp et al, 2005).

Les anticorps monoclonaux anti-EGFR ont d'abord été étudiés en situation métastatique.

Le cetuximab est un anticorps monoclonal chimérique humanisé de type IgG1, ayant une plus grande affinité pour l'EGFR que l'EGF ou le TGF $\alpha$ . L'essai de phase II randomisé, qui a servi de base à l'AMM du cetuximab, a comparé le cetuximab en monothérapie au cetuximab en association à l'irinotecan chez 329 patients atteints d'un CCR métastatique exprimant l'EGFR, réfractaires à l'irinotecan. Le taux de réponse était plus élevé dans le groupe traitement combiné par rapport au groupe traité par cetuximab en monothérapie (22,9% contre 10,8%,  $p=0,007$ ). La survie sans progression (SSP) était meilleure dans le groupe traitement combiné par rapport au groupe monothérapie (4,1 contre 1,5 mois,  $p<0,001$ ). La survie médiane était de 8,6 mois dans le groupe irinotecan et cetuximab, et de 6,9 mois dans le groupe cetuximab seul ( $p=0,48$ ), faisant préférer la combinaison chez les patients devenus réfractaires à l'irinotecan (Cunningham et al., 2004). De nombreuses études ont confirmé l'intérêt de ce traitement dans le CCR métastatique. Certaines études ont confirmé que le cetuximab était actif en monothérapie dans les CCR, notamment en dernière ligne de traitement comparé aux soins de support, permettant une amélioration de la survie globale par rapport aux soins de support (HR : 0,77,  $p=0,005$ ) ainsi que de la SSP (HR = 0,68,  $p<0,001$ ) (Jonker et al., 2007).

Enfin, en première ligne métastatique, les deux essais OPUS et CRYSTAL ont démontré l'efficacité du cetuximab en association avec une chimiothérapie. Dans

l'essai OPUS comparant le cetuximab associé à la chimiothérapie FOLFOX à la chimiothérapie seule chez 344 patients, le taux de réponse était supérieur dans le groupe cetuximab mais pas de façon significative. La stratification selon le statut mutationnel *KRAS* montrait, uniquement chez les patient avec un *KRAS* sauvage, une augmentation du taux de réponse (61% contre 37%,  $p=0,011$ ) et une augmentation de la SSP (HR = 0,57,  $p=0,0163$ ) dans le groupe cetuximab (Bokemeyer et al., 2009). Deux autres essais ne confirment pas ces résultats. La première de ces études est l'essai COIN, qui comparait le cetuximab en association à la chimiothérapie à base de fluoropyrimidine (5FU ou capecitabine) et oxaliplatine, à la chimiothérapie seule chez 1630 patients en première ligne de traitement pour une CCR métastatique. Chez les patients sans mutation *KRAS*, le taux de réponse était supérieur dans le groupe cetuximab (64% contre 57%,  $p=0,049$ ). Par contre, il n'existait pas de différence en terme de SG et de SSP. Il est à noter que 2/3 des patients recevait de la capecitabine. De plus, dans une étude exploratoire, il semblait que le cetuximab soit plus efficace en combinaison avec le FOLFOX que le CAPOX (Maughan et al., 2011). L'autre essai contradictoire est l'essai NORDIC-VII, qui comparait l'association du cetuximab au régime de chimiothérapie FLOX (oxaliplatine et 5FU en bolus), à la chimiothérapie seule. Un total de 571 patients a été randomisé. Dans le sous-groupe des patients sans mutation *KRAS*, il n'a pas été mis en évidence de différence en terme de réponse ou de survie (Tveit et al., 2012). L'ensemble de ces données pose la question de la place du cetuximab en association avec l'oxaliplatine en première ligne de traitement. Une méta-analyse de ces études permettrait probablement de répondre à cette question.

Dans l'essai CRYSTAL, 1198 patients ont été randomisés pour recevoir du FOLFIRI avec ou sans cetuximab. La SSP était plus longue dans le groupe



cetuximab comparé au groupe chimiothérapie seule (HR=0,72, p=0,048), d'autant plus que les patients présentaient un *KRAS* sauvage (HR = 0,68, p=0,02) alors qu'il n'y avait pas de différence en cas de mutation *KRAS* (Van Cutsem et al., 2009). Le résultat de ces études a radicalement modifié la pratique clinique courante, car la prescription des anticorps anti-EGFR cetuximab et panitumumab est conditionnée par le statut *KRAS* de la tumeur.

L'autre anticorps monoclonal visant l'EGFR, de type IgG2, ayant une AMM dans le CCR métastatique, est le panitumumab. En 2007, une étude de phase III a comparé le panitumumab, aux soins de support, dans une population de 463 patients ayant progressé sous 5FU, irinotecan et oxaliplatine. Le panitumumab a amélioré la SSP (HR=0,54, p=0,0001). La SSP médiane était de 8 semaines sous panitumumab et de 7,3 semaines avec les soins de support. Le taux de réponse objective était de 10% sous panitumumab contre 0% avec les soins de supports (p=0,0001). Aucune différence n'était démontrée en terme de survie globale SG (HR=1,00), mais 76% des patients dans le groupe soins de confort ont reçu le panitumumab en définitive, du fait du cross-over existant dans cette étude. Cette étude permet l'obtention de l'AMM (Van Cutsem et al., 2007). Une étude de phase 3, incluant 1183 patients, a montré l'efficacité du panitumumab en première ligne de traitement, en association avec le FOLFOX. Parmi les patients sans mutation *KRAS*, la SSP était allongée dans le groupe panitumumab comparée au groupe chimiothérapie (9,6 contre 8 mois, p=0,02) alors qu'elle était diminuée parmi les patients mutés *KRAS* (HR = 1,29, p=0,02) (Douillard et al., 2010). Une autre étude a comparé l'ajout du panitumumab au FOLFIRI en deuxième ligne de traitement chez 1186 patients. Il n'y avait pas de bénéfice à ajouter le panitumumab chez les patients avec une mutation *KRAS*, alors

que la SSP était allongée par l'ajout du panitumumab au FOLFIRI chez les patients avec un *KRAS* sauvage (HR=0,73, p=0,004) (Peeters et al., 2010).

Un tableau récapitulatif reprend les données des principales études des anticorps anti-EGFR dans le traitement du CCR métastatique.

**Tableau 1 : tableau récapitulatif des principales études cetuximab et panitumumab en situation métastatique**

| 3 <sup>e</sup> ligne                      |        |              |                   |                       |
|-------------------------------------------|--------|--------------|-------------------|-----------------------|
| NCIC CO17<br>(Jonker et al.,<br>2007)     | N=572  |              | cetuximab         | Soins de support      |
|                                           |        | réponse      | 8%                | 0% P=0,001            |
|                                           |        | SSP à 3 mois | 41%               | 24% P<0,001           |
|                                           |        | SG           | 6,1 mois          | 4,6 mois P=0,005      |
| (Van Cutsem et al., 2007)                 | N=463  |              | panitumumab       | Soins de support      |
|                                           |        | réponse      | 10%               | 0% P<0,0001           |
|                                           |        | SSP          | 8 semaines        | 7,3 semaines P<0,0001 |
| 2 <sup>e</sup> ligne                      |        |              |                   |                       |
| BOND phase 2<br>(Cunningham et al., 2004) | N=329  |              | Cetuximab + CPT11 | cetuximab             |
|                                           |        | réponse      | 23%               | 10,8% P=0,007         |
|                                           |        | SSP          | 4,1 mois          | 1,5 mois P<0,001      |
| EPIC phase 3<br>(Sobrero et al., 2008)    | N=1298 |              | Cetuximab + CPT11 | CPT11                 |
|                                           |        | Réponse      | 16,4%             | 4,2% P=0,0001         |
|                                           |        | SSP          | 4 mois            | 2,6 mois P=0,0001     |
| (Peeters et al.,                          | N=1186 |              | Panitumumab       | FOLFIRI               |

|       |         |           |          |          |
|-------|---------|-----------|----------|----------|
| 2010) |         | + FOLFIRI |          |          |
|       | Réponse | 35%       | 10%      | P<0,0001 |
|       | SSP     | 5,9 mois  | 3,9 mois | P0 ,004  |

| 1 <sup>è</sup> ligne                    |        |         |                                 |                  |          |
|-----------------------------------------|--------|---------|---------------------------------|------------------|----------|
| CRYSTAL<br>(Van Cutsem<br>et al., 2009) | N=1217 |         | Cetuximab +<br>FOLFIRI          | FOLFIRI          |          |
|                                         |        | Réponse | 46,9%                           | 38,7%            | P=0,003  |
|                                         |        | SSP     | 9,9 mois                        | 8,7 mois         | P=0,02*  |
| OPUS<br>(Bokemeyer<br>et al., 2009)     | N=344  |         | Cetuximab +<br>FOLFOX           | FOLFOX           |          |
|                                         |        | réponse | 61%                             | 37%              | P=0,064* |
|                                         |        | SSP     | 7,7mois                         | 7,2 mois         | P=0,016* |
| COIN<br>(Maughan et<br>al., 2011)       | N=1630 |         | Cetuximab +<br>FOLFOX/CA<br>POX | FOLFOX/CA<br>POX |          |
|                                         |        | réponse | 64%                             | 57%              | P=0,049* |
|                                         |        | SSP     | 8,6 mois                        | 8,6mois          | P=0,60*  |
|                                         |        | SG      | 17,9mois                        | 17mois           | P=0,67*  |
| NORDIC-VII<br>(Tveit et al.,<br>2012)   | N=571  |         | Cetuximab +<br>FLOX             | FLOX             |          |
|                                         |        | réponse | 46%                             | 47%              | P=0,89*  |
|                                         |        | SSP     | 7,9mois                         | 8,7mois          | P=0,66*  |
|                                         |        | SG      | 20,1mois                        | 22mois           | P=0,48*  |
| PRIME<br>(Douillard et<br>al., 2010)    | N=1183 |         | Panitumumab<br>+ FOLFIRI        | FOLFIRI          |          |
|                                         |        | réponse | 55%                             | 48%              | P=0,068* |

|     |          |        |         |
|-----|----------|--------|---------|
| SSP | 9,6 mois | 8 mois | P=0,02* |
|-----|----------|--------|---------|

\* résultats concernant uniquement les patients avec une tumeur *KRAS* sauvage

Compte-tenu des résultats obtenus en situation métastatique, des études ont été menées sur le cetuximab en situation adjuvante et néoadjuvante.

En situation adjuvante, le cetuximab n'apporte pas de bénéfice en SSR en association avec la chimiothérapie par FOLFOX. Ainsi, deux études ont montré des résultats négatifs. La première étude américaine a porté sur 2686 patients, et montre chez les patients sans mutation *KRAS*, une SSR à 3 ans de 74,6% dans le groupe FOLFOX et de 71,5% dans le groupe avec le cetuximab (HR : 1,21 ; p=0,08). Le taux d'effets secondaires de grade 3 et plus, et l'arrêt prématuré du traitement étaient significativement plus élevés dans le groupe cetuximab, de façon significative (p<0,001) (Alberts et al., 2012). Une deuxième étude européenne, PETACC 8, a inclus un total de 1602 patients avec un *KRAS* sauvage, et la survie sans récurrence (SSR) n'était pas modifiée par l'ajout du cetuximab, avec une SSR à 3 ans de 78% dans le bras cetuximab contre 75,1% dans le bras chimiothérapie seule, selon les résultats de l'étude intermédiaire (Salazar et al., 2012)

En situation néoadjuvante, dans le cancer du rectum, l'ajout du cetuximab à la chimiothérapie de type CAPOX, précédant la radiothérapie et suivant la chirurgie a été testé. Sur 90 patients sans mutation *KRAS*, le cetuximab n'augmentait ni le taux de réponse complète histologique (9 dans le groupe CAPOX contre 11% dans le groupe avec cetuximab; p=1,0), ni la SSP (HR : 0,65 ; p=0,363). Par contre, il améliorait la SG (HR=0,27 ; p=0,034), et le taux de réponse après

radiochimiothérapie (75 contre 93% ;  $p=0,028$ ), mais ceci au prix d'une toxicité accrue, aux niveaux digestif et cutané (Dewdney et al., 2012). Ces résultats sont à mettre en balance avec d'autres études ne montrant pas l'intérêt de l'ajout du cetuximab en situation néoadjuvante (Kim et al., 2012b ; Horisberger et al., 2009).

## **I.2 Facteurs prédictifs de réponse aux anti-EGFR dans le cancer du colon**

La présence de mutations du proto-oncogène *KRAS* est rencontrée dans 37% des CCR, et est associée à une augmentation de risque de récurrence et de décès dans le cancer colorectal (Andreyev et al., 1998). D'autre part, les mutations *KRAS* avaient été décrites comme associées à la résistance aux TKI dans le traitement des adénocarcinomes pulmonaires (Pao et al., 2005 ; Eberhard et al., 2005 ; van Zandwijk et al., 2007).. Dans le CBNPC, les mutations *KRAS* existent essentiellement dans les adénocarcinomes, et chez les fumeurs. D'autre part, les mutations *KRAS* et du domaine TK de l'*EGFR* semblent exclusives dans le CBNPC (Ahrendt et al., 2001 ; Shigematsu et al., 2005).

A partir de ces résultats concernant la relation entre les mutations *KRAS* et la réponse aux TKI dans le CBNPC, et du fait de la fréquence des mutations *KRAS* dans le CCR, il était logique de s'intéresser à la relation existant entre ces mutations et la réponse au cetuximab dans le CCR métastatique.

Plusieurs études ont mis en évidence une absence de réponse au traitement par cetuximab dans le CCR métastatique. Notamment, le premier travail décrivant le lien entre les mutations *KRAS* et l'absence de réponse, a étudié la relation entre la présence d'une mutation *KRAS* chez des patients atteints d'un CCR métastatique

avec la réponse et la survie des patients (Lievre et al., 2006). Les données de celui-ci ont été mises à jour avec un nombre plus important de patients.

A partir d'un échantillon de 114 patients, une analyse moléculaire du gène *KRAS* a été réalisée par la technique de discrimination allélique. Les mutations de *KRAS* étaient présentes dans 31,6% des cas. Ainsi, l'absence de mutation de *KRAS* au niveau de l'ADN extrait des cellules tumorales est pronostique de la réponse au cetuximab. Aucun des patients présentant une mutation *KRAS* ne répondait au cetuximab, alors qu'une réponse était présente chez 43,6% des patients *KRAS* sauvage ( $p < 0,001$ ). Par ailleurs, la SSP et la SG étaient diminuées en cas de mutation *KRAS* (SSP médiane : 9 contre 32 semaines,  $p = 1,4 \cdot 10^{-7}$  ; SG médiane : 10,1 contre 14,3 mois,  $p = 0,017$ ) (Lievre et al., 2008).

**Tableau 2 : Réponse au cetuximab en fonction du statut mutationnel *KRAS* dans l'étude Lièvre et al., 2008**

|                   | Répondeurs | Non répondeurs | total |
|-------------------|------------|----------------|-------|
| KRAS muté (%)     | 0 (0)      | 36 (100)       | 36    |
| KRAS non muté (%) | 34 (43)    | 44 (56)        | 78    |
| total             | 34         | 80             | 114   |

D'après ces données, les mutations de *KRAS* constituent un marqueur prédictif de résistance au cetuximab. Cependant, parmi les tumeurs colorectales sans mutation du gène *KRAS*, une forte proportion des patients (57%) ne répondent

pas au cetuximab, reflétant la présence d'un autre facteur de résistance au traitement, notamment au niveau des autres partenaires des deux principales voies de signalisation activées par l'EGFR, c'est-à-dire les voies RAS/MAPK et la voie PI3K/AKT. Il apparaît donc important d'étudier ces deux voies de signalisation, afin d'améliorer notre compréhension de leur comportement au sein du CCR, et d'essayer d'en dégager des facteurs pronostiques de réponse au cetuximab en complément des mutations de *KRAS* (Lievre et al., 2008).

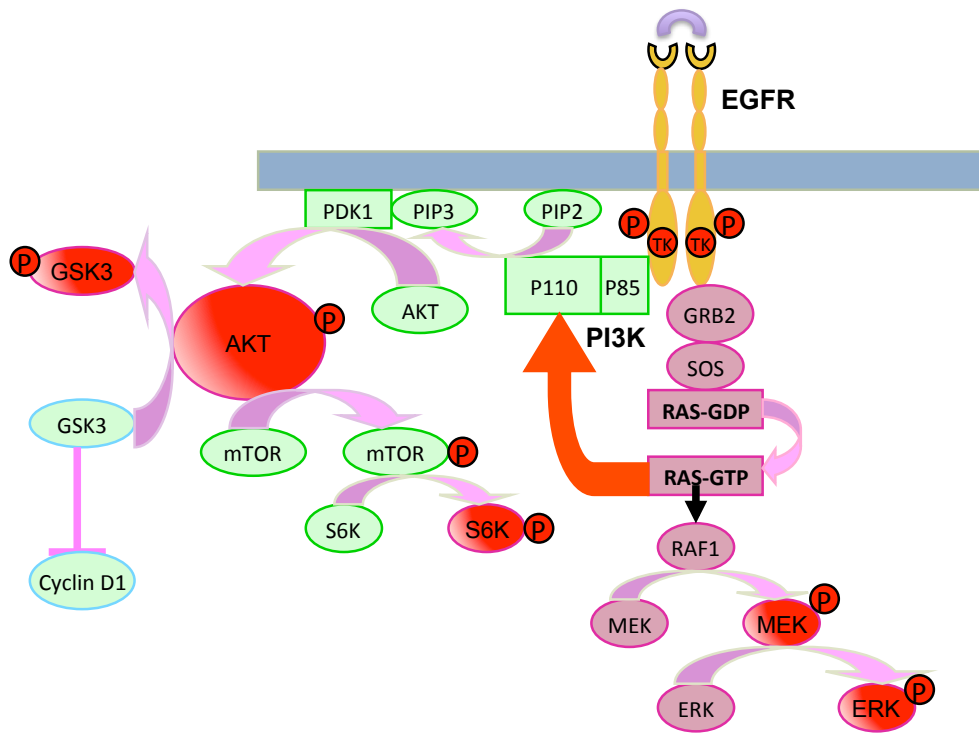
## II. Objectifs de l'étude

### II.1 Hypothèse du travail

Ce travail avait pour but de rechercher au sein des voies de signalisation en aval de l'EGFR, d'autres facteurs prédictifs de réponse au cetuximab. A partir de la population de l'étude sus-citée, nous avons sélectionné les patients pour lesquels du tissu tumoral colique congelé était disponible. Le statut mutationnel *KRAS* était déjà déterminé lors de la précédente étude. Nous avons étudié l'activation des 2 principales voies de signalisation de l'EGFR, les voies PI3K et MAPK. La méthode du Bioplex protein Array a permis de déterminer la quantité de certaines protéines phosphorylées dans ces 2 voies, phospho-MEK1 et phospho-ERK1/2 pour la voie MAPK, phospho-AKT, phospho-P70S6K et phospho-GSK3 pour la voie PI3K. Nous avons ensuite étudié la corrélation entre ces taux de phosphoprotéines et le statut mutationnel *KRAS*, la réponse, la survie sans progression et la survie globale au cetuximab.



**Figure 3 : schéma simplifié récapitulatif des voies de signalisation de l'EGFR illustrant les différents biomarqueurs étudiés dans le travail de thèse**



## II.2 Description de la technique du Bioplex Protein Array

L'expression des phosphoprotéines appartenant aux voies de signalisations de l'EGFR (pMEK, pERK, pAKT, pP70 et pGSK3) a été déterminée par la technique d'immuno-analyse multiplex de Bioplex Protein Array (Biorad, Hercules, CA). Il s'agit d'une technique de dosage en plaque 96 puits, basée sur une double reconnaissance en « sandwich » des phosphoprotéines par des anticorps spécifiques, et une détection et quantification par mesure de fluorescence.

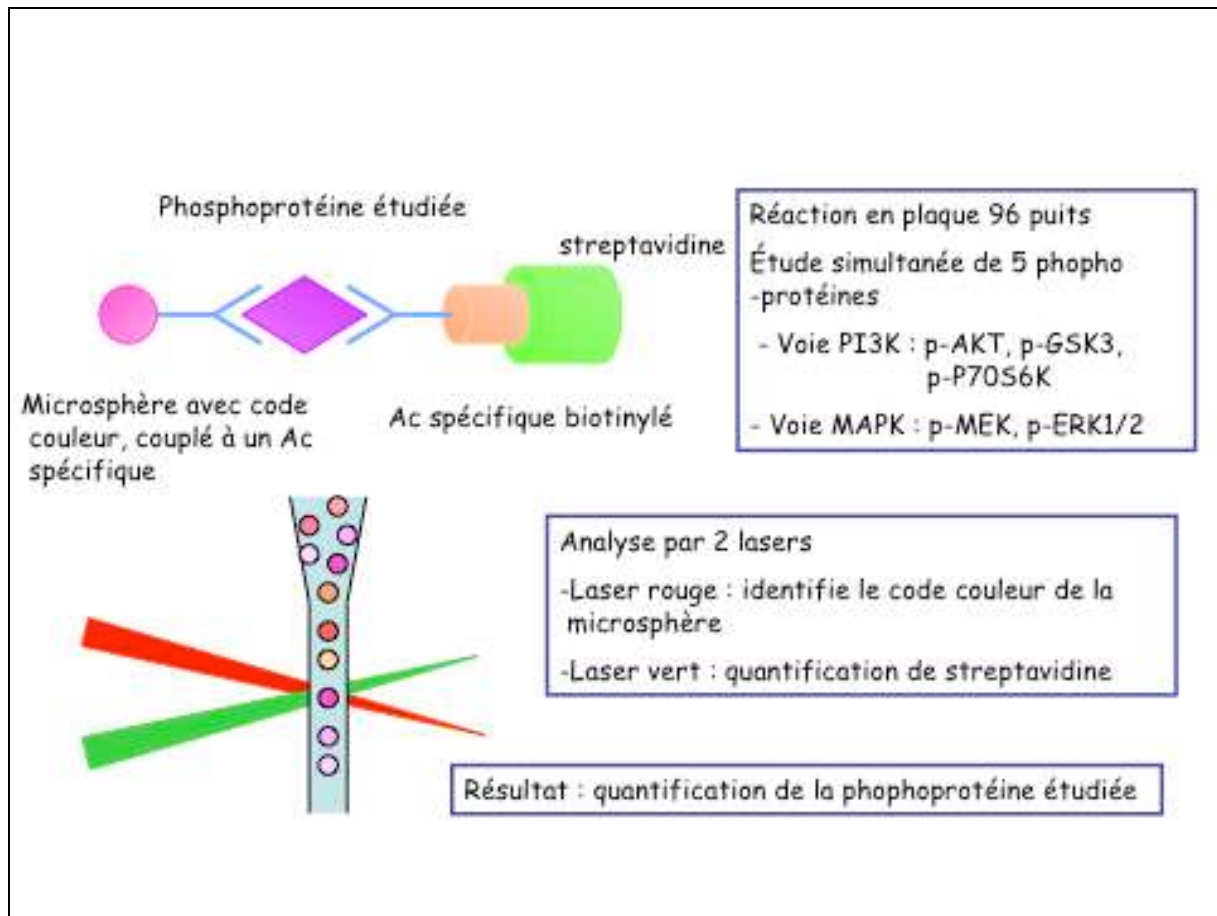
Cette technique utilise des microbilles teintées par 2 fluorophores différents, leur conférant un code couleur spécifique. Les billes avec un même code couleur sont couplées à un anticorps spécifique d'une phosphoprotéine. Le code couleur spécifique d'une microbille correspond donc à une phosphoprotéine spécifique. Une deuxième série d'anticorps spécifiques d'un deuxième épitope de la phosphoprotéine étudiée est ajoutée. Ces anticorps biotinylés sont détectés par une réaction avec la streptavidine couplée à un fluorophore : la phycoérythrine.

Sur une plaque 96 puits, les échantillons protéiques dilués des 42 tumeurs (en triplicats) sont disposés dans les puits, mélangés à 25 $\mu$ L de solution tampon. Les billes couplées aux anticorps spécifiques des phosphoprotéines étudiées sont ajoutées dans chaque puit, pour une incubation toute la nuit. Le lendemain, les plaques sont lavées et incubées avec la seconde série d'anticorps biotinylés spécifiques. Une solution de streptavidine couplée au fluorophore phycoérythrine est ensuite ajoutée. La lecture utilise une analyse simultanée par double fluorescence. Le premier laser (fluorescence rouge) permet l'identification de la phosphoprotéine, par la détection du code couleur de la bille couplée à l'anticorps spécifique. Le second laser (fluorescence verte) permet la quantification de la phosphoprotéine, par

la mesure de la fluorescence émise par la phycoérythrine, proportionnelle à la quantité d'anticorps biotynilé fixé sur la phosphoprotéine. La double détection simultanée des 2 fluorescences permet donc la quantification d'une phosphoprotéine donnée dans l'échantillon protéique étudié. Une fluorescence moyenne est alors enregistrée et comparée à des contrôles négatifs. Des extraits protéiques standards de lignées cellulaires servent de contrôles positifs. Tous les résultats des différentes séries sont normalisés en les rapportant à ceux d'un même échantillon tumoral. Les valeurs d'expression des phosphoprotéines sont exprimées en unité arbitraire.

L'utilisation de cette technique sur des échantillons cliniques a été validée dans une série de 49 tumeurs du sein congelées, par comparaison avec la technique du Western Blot. L'expression des phosphoprotéines p-EGFR, p-AKT, p-GSK3beta, pP70S6K, p-MEK1, p-ERK1/2 et p-P38MAPK, mesurée par la technique du BPA a été comparée à celle mesurée par la technique du Western Blot. La régression linéaire a montré une corrélation significative entre les 2 techniques, avec un coefficient de régression allant de 0,71 à 0,87 ( $p < 0,001$ ). La reproductibilité du BPA était bonne, avec des coefficients de variation intra et inter-expérience inférieurs à 17% et 15%, respectivement (Chergui et al., 2009). De plus, le Bioplex Protein Array a permis d'étudier les voies de signalisation de l'EGFR dans plusieurs travaux (Bouali et al., 2009 ; Mriouah et al., 2010).

Figure 4 : Schéma illustrant la technique du Bioplex Protein Array



### III. Résultats

Les résultats de ce travail ont été publiés en 2010 dans International Journal of Cancer, dont voici la référence :

Perkins G, Lièvre A, Ramacci C, Méatchi T, de Reynies A, Emile JF, Boige V, Tomasic G, Bachet JB, Bibeau F, Bouché O, Penault-Llorca F, Merlin JL, Laurent-Puig P. (2010). "Additional value of EGFR downstream signaling phosphoprotein expression to KRAS status for response to anti-EGFR antibodies in colorectal cancer." Int J Cancer **127**(6): 1321-31.

Notre travail a permis de mettre en évidence des facteurs pronostiques de réponse au cetuximab au sein des voies de signalisation en aval de l'EGFR. Ainsi, l'expression de p-P70S6K est trouvée plus faible chez les patients répondeurs ( $p=0,02$ ). La survie sans progression (SSP) est supérieure en cas d'expression faible de p-P70S6K ( $p=0,0001$ ) et p-MEK ( $p=0,0006$ ). p-MEK et p-P70S6K ont une expression plus élevée chez les patients *KRAS* mutés et apparaissent comme deux marqueurs pronostiques indépendants de *KRAS* (HR 0,34,  $p=0,01$  et HR 0,42,  $p=0,03$ ). Ainsi, le niveau d'expression des phosphoprotéines en aval de l'EGFR pourrait prédire la réponse et la SSP dans les CCR traités par anti-EGFR, indépendamment du statut *KRAS*.

## **IV. Discussion**

Notre travail a permis de mettre en évidence de nouveaux marqueurs prédictifs de réponse au cetuximab dans le CCR métastatique, au niveau des voies de signalisation en aval de l'EGFR. D'autres marqueurs ont déjà été identifiés, sur le plan clinique et biologique. Bien que les anticorps anti-EGFR aient permis d'améliorer le pronostic des patients atteints d'un CCR métastatique, cette recherche de biomarqueurs est motivée par l'existence d'une toxicité propre des anticorps anti-EGFR et de leur coût important, afin de mieux sélectionner les patients susceptibles d'en bénéficier et de ne pas commencer un traitement non efficace chez les patients ayant un cancer d'emblée résistant à la thérapeutique. D'autre part, ceci permet de comprendre les mécanismes de résistance secondaires ou primaire, et d'envisager d'autres traitements ou des combinaisons possibles avec les anti-EGFR de première génération. Plusieurs facteurs prédictifs ont déjà été étudiés, avec en premier les mutations *KRAS*, mais aussi par exemple la toxicité cutanée, l'expression l'amplification et la mutation du gène de l'EGFR.

### **IV.1 Les facteurs prédictifs de réponse au cetuximab : *KRAS* et au delà de *KRAS***

#### **IV.1.1 Mutation *KRAS* et résistance aux anti-EGFR**

Les protéines de la famille RAS (*KRAS*, *NRAS*, *HRAS*) sont des membres de la superfamille des petites protéines G. Elles existent sous deux formes GDP/GTP, et activent des signaux intracellulaires. Les mutations affectant les codons 12, 13 ou 61, entraînent un blocage de la protéine sous la forme GTP activée. Les protéines RAS sont très homologues, partageant les premiers 90% de la structure protéique.

Une mutation *RAS* est présente chez 30% des tous les adénocarcinomes. Concernant le CCR, la mutation du gène *KRAS* est présente dans 37,5% des CCR, alors que les mutations de *NRAS* sont beaucoup moins fréquentes (5%). Alors qu'une perte de fonction d'APC est connue pour initier la croissance tumorale, *KRAS* muté est plutôt associé à la progression dysplasique d'un adénome au stade d'adénocarcinome (Vogelstein et al., 1988). L'étude multicentrique RASCAL comprenant les données de 2721 patients a montré la présence d'une mutation de *KRAS* dans 38% des CCR, et sa présence était associée à une augmentation de risque de récurrence (HR = 1,25,  $p < 0,001$ ) et de décès (HR= 1,22,  $p = 0,004$ ) (Andreyev et al., 1998). Une mise à jour plus récente de cette étude, RASCAL II, comprenant un total de 3439 patients, avait suggéré qu'un type de mutation était plus agressif que les autres. Ainsi, 12 mutations de *KRAS* étaient possibles sur les codons 12 et 13 mais seule une mutation du codon 12, remplaçant une glycine par une valine (G12V), présente chez 8,6% de tous les patients de l'étude, avait un impact significatif sur la survie sans récurrence (HR=1,3,  $p = 0,004$ ) et la survie globale (HR=1,29,  $p = 0,008$ ) (Andreyev et al., 2001).

Concernant les CCR non métastatiques, des résultats contradictoires existent concernant l'influence d'une mutation *KRAS* sur la survie en fonction des stades de la tumeur (McDermott et al., 2002). Ainsi, dans l'étude RASCAL II, la présence de la mutation *KRAS* G12V avait un impact sur la survie des patients de façon significative dans le stade III (survie sans récurrence :  $P = 0,008$ ; SG :  $P = 0,02$ ) par rapport au stade II (survie sans récurrence :  $p = 0,46$ ; SG,  $p = 0,36$ ) (Andreyev et al., 2001). En opposition, une étude portant sur la survie et la réponse à la chimiothérapie a montré que le taux de survie à 7 ans était plus faible dans les stades II en cas de mutation *KRAS* (86%

contre 58%, HR = 3,8, p=0,007) alors qu'il n'existait pas de différence en cas de mutation *KRAS* dans les stades III (Ahnen et al., 1998).

De nombreuses études rétrospectives ont porté sur l'étude des mutations *KRAS* dans le cancer colorectal et la relation avec la réponse et la survie sous cetuximab (Lievre et al., 2006 ; Lievre et al., 2008 ; Di Fiore et al., 2007 ; Benvenuti et al., 2007 ; De Roock et al., 2008).

Ainsi, un premier travail du laboratoire a mis en évidence cette relation. A partir de 30 patients atteints d'un CCR métastatique traité par cetuximab, un séquençage de l'exon 2 du gène *KRAS* a été réalisé. Une mutation *KRAS* était présente dans 43% des cas. Aucun des patients répondeurs n'était porteur de mutation, alors que 68,4% des non répondeurs avaient la mutation (p=0,0003). Par ailleurs, la SG des patients sans mutation était plus importante que chez les patients porteurs de la mutation (16,3 contre 6,9 mois, p=0,016) (Lievre et al., 2006). Un travail plus récent portant sur 114 patients incluant les 30 de la première étude a confirmé ces conclusions, les résultats ayant déjà été exposés dans l'introduction (Lievre et al., 2008).

Par la suite, de nombreuses études prospectives ont permis de confirmer l'absence de réponse aux anticorps anti-EGFR en cas de présence d'une mutation du gène *KRAS*. Concernant le cetuximab, deux essais ont étudiées l'association du cetuximab en première ligne avec une chimiothérapie de type FOLFOX (OPUS) ou de type FOLFIRI (CRYSTAL) décrites précédemment.

Cette attitude est déjà adoptée concernant le panitumumab, l'étude princeps, base de l'autorisation de la FDA, ayant mis en évidence l'absence de réponse et la diminution de survie en cas de mutation *KRAS*. En effet, cette étude de phase III



comparait le panitumumab aux soins de confort chez 427 patients porteurs d'un CCR métastatique. Une mutation *KRAS* était rapportée dans 43% des cas. Dans le groupe des patients sans mutation, La SSP médiane était plus longue dans le groupe panitumumab par rapport au groupe soins de confort (12,3 contre 7,3 semaines,  $p < 0,0001$ ), alors qu'il n'existait pas de différence en terme de SSP entre les 2 groupes lorsque les patients avaient une mutation (SSP médiane : 7,4 contre 7,3 semaines). Ainsi, aucun bénéfice à recevoir du panitumumab n'existe pour les patients porteurs d'une mutation *KRAS*. La recherche du statut mutationnel *KRAS* est un préalable à la mise sous traitement par panitumumab, et la présence d'une mutation est une contre-indication au traitement (Amado et al., 2008).

D'après ces données, les mutations de *KRAS* constituent donc un marqueur prédictif de résistance au cetuximab et au panitumumab. Récemment, des études ont soulevé un cas particulier parmi les mutations *KRAS* : la mutation G13D (Mao et al., 2012). Cette mutation particulière représente environ 15% des mutations *KRAS*. L'analyse des données poolées des essais OPUS et CRYSTAL, a mis en évidence, que dans le sous-groupe des patients avec cette mutation du codon 13, il existe une amélioration du taux de réponse (40,5 contre 22,0%,  $p = 0,042$ ) et de la SSP (7,4 contre 6,0 mois,  $p = 0,042$ ), mais pas de la SG, en cas de traitement par cetuximab et chimiothérapie comparé à la chimiothérapie seule (Tejpar et al., 2012). Des données pré-cliniques montrent, dans des lignées cellulaires porteuses de mutation *KRAS* G12V ou G13D, alors que les lignées G12V sont insensibles au cetuximab, les lignées G13D sont quasi aussi sensibles que les cellules sans mutation *KRAS* (De Roock et al., 2010). Ces données sont controversées et débattues à l'heure actuelle. Une des hypothèses pour expliquer cette différence serait le mauvais pronostic des tumeurs mutées G13D sous chimiothérapie seule, comparé aux autres mutations de

*KRAS*. Par ailleurs, Peeters et al. a présenté en 2011 les données poolées de 3 études de phase III sur le panitumumab, ne montrant aucune différence concernant le devenir des patients sous panitumumab en fonction du type de mutation *KRAS* (Peeters et al., 2011). Il faut donc prendre les résultats concernant la mutation *KRAS G13D* avec précaution.

Enfin, l'acquisition de mutation *KRAS* pourrait être une explication à la résistance acquise aux anticorps anti-EGFR. Dans le travail de Misale et al, chez 10 patients devenus résistants au traitement, une recherche de mutation *KRAS* à partir des biopsies pré et post-traitement au moment de la progression a été effectuée. Sur les 10 patients, aucune mutation *KRAS* n'était présente au diagnostic, alors que 6 cas de mutation *KRAS* sont apparus en cours de traitement (Misale et al., 2012).

#### **IV.1.2 Activation en aval de *KRAS* : les voies MAPK et PI3K**

Cependant, parmi les tumeurs colorectales sans mutation du gène *KRAS*, une forte proportion des patients (57%) ne répondent pas au cetuximab, reflétant la présence d'un autre facteur de résistance au traitement. Par ailleurs, parmi le groupe des tumeurs mutées *KRAS*, 39% présentent une stabilité de la maladie, ce qui dans une maladie métastatique peut permettre une prolongation de la survie. Ces deux éléments suggèrent la présence d'autres facteurs impliqués dans la modulation de la réponse à cette thérapie ciblée notamment au niveau des autres partenaires des deux principales voies de signalisation activées par l'EGFR, c'est-à-dire les voies RAS/MAPK et la voie PI3K/AKT.

Les résultats de notre travail pourraient permettre en partie d'expliquer l'absence de réponse au cetuximab pour les tumeurs sans mutation *KRAS*, par

l'activation constitutionnelle des voies PI3K et/ou MAPK, indépendamment de *KRAS*. Le but de notre travail était de rechercher au niveau des deux principales voies de signalisation activées par *KRAS*, les voies MAPK et PI3K, des facteurs associés à la réponse et à la survie au cetuximab. En effet, même si *KRAS* est un facteur puissant prédictif de résistance au cetuximab, celui-ci n'est pas parfait. Ainsi, 23% de patients non mutés *KRAS* progressent sous traitement, suggérant l'existence d'autres facteurs de résistance au cetuximab. Notre travail a mis en évidence pour la première fois dans le CCR une activation d'effecteurs des 2 voies de signalisation, les voies MAPK et PI3K. En cas de mutation *KRAS*, l'expression des phosphoprotéines appartenant aux 2 voies était plus importante qu'en absence de mutation, de façon significative pour p70S6K et GSK3B pour la voie PI3K, et MEK1 pour la voie MAPK. Ce résultat paraît logique au vu des connaissances du fonctionnement de la voie de signalisation RAS/MAPK, la protéine RAS activée entraînant une cascade de phosphorylation aboutissant à l'activation des protéines MEK et ERK situées en aval.

Peu de données existent sur le niveau d'activation des voies MAPK et PI3K dans le CCR. Concernant la voie MAPK, des études se sont intéressées à l'expression de phospho-ERK. Ainsi, le taux de phosphorylation de ERK dans le cancer colorectal est trouvé corrélé au grade histologique et le stade de la tumeur, marqueurs d'agressivité de la tumeur (Levidou et al., 2012). D'autre part, des travaux ont mis en évidence une activation de la voie MAPK en cas de mutation *KRAS*. Une étude avait évalué une série de 135 patients traités par chimiothérapie adjuvante à base de 5FU ou FOLFOX après résection d'un CCR. Une augmentation de la forme phosphorylée de ERK, mais pas de celle de AKT, était trouvée en cas de mutation *KRAS* ( $p=0,0015$ ). D'autre part, l'analyse multivariée identifiait la forme

phosphorylée de ERK comme un paramètre pronostique indépendant de la survie globale des patients (Schmitz et al., 2007). Une autre étude montre que des cellules mutées *KRAS* présentaient une élévation du taux de phosphoprotéine MEK mais pas de la phosphoprotéine ERK (Haigis et al., 2008).

Concernant la voie PI3K, l'effet des mutations *KRAS* sur l'activation de cette voie a été étudiée. A partir de cellules mutées et des cellules non mutées *KRAS*, la présence d'une mutation *KRAS* entraînait l'augmentation de production de ligands de l'EGFR, TGF alpha et amphireguline, qui eux-même entraînent une activation de la voie PI3K par la phosphorylation de l'EGFR (Toulany et al., 2005). D'autre part, l'activation des phosphoprotéines de la voie PI3K par *KRAS* muté peut être expliqué par la possibilité d'activation directe de PI3K par RAS (Mor et al., 2006).

Dans notre travail, seule l'expression de la phosphoprotéine pP70S6K était associée à la réponse au cetuximab, qui était plus faible chez les patients répondeurs par rapport aux patients non répondeurs. En analyse univariée, l'expression de l'ensemble des phosphoprotéines était associée à la SSP, leur expression étant plus faible chez les répondeurs. Par ailleurs, en analyse multivariée, seule l'expression de p70S6K et de MEK étaient associée à la SSP, et ce indépendamment du statut mutationnel de *KRAS*. Ainsi, une faible activation des 2 voies de signalisation est associée à une augmentation de la SSP. Concernant la SG, seule une faible expression de la phosphoprotéine p70S6K est associée à une augmentation de la SG, en analyse uni et multivariée. Ainsi, une activation des 2 voies de signalisation MAPK et PI3K indépendamment d'une mutation *KRAS* semble pronostique de résistance au traitement par cetuximab, et de diminution de survie.

Concernant le rôle pronostique de l'activation de la voie PI3K, des travaux effectués dans le CBNPC traité par TKI, et dans les cancers ORL traités par cetuximab, donnent des résultats ne corrélant pas les nôtres. En effet, deux études montrent une corrélation positive entre la phosphorylation de la protéine AKT, faisant partie de la voie PI3K, et la réponse au gefitinib dans le CBNPC. La première étude comprenant 103 patients traités par gefitinib pour un CBNPC montre une association entre le marquage de phospho-AKT en IHC et le taux de réponse au gefitinib d'une part (26,1% contre 3,9%,  $p=0,003$ ), et la SSP d'autre part (5,5 contre 2,8 mois,  $p=0,004$ ) (Cappuzzo et al., 2004). Une autre étude par Western Blot sur lignées cellulaires, montre un rapport entre la forme phosphorylée et la forme totale de AKT, plus élevé dans les cellules sensibles au gefitinib par rapport aux cellules résistantes ( $p=0,003$ ) (Noro et al., 2006). Dans le cancer ORL, un travail utilisant la même méthode de Bioplex Protein Array que dans notre étude, s'est intéressée à la relation entre l'expression de phosphoprotéines des voies PI3K et MAPK et la réponse au cetuximab. Les cellules avec une expression basale élevée de phospho-AKT sont plus sensibles au traitement par cetuximab (Mriouah et al., 2010).

Selon nos résultats, des patients sans mutation *KRAS* mais avec un taux élevé de phosphoprotéine pP70S6K ou pMEK ont une SSP plus courte que les patients avec un taux bas de ces phosphoprotéines. Ce résultat est concordant avec un autre travail paru récemment étudiant des métastases de patients avec un CCR sans mutation *KRAS* et traités par cetuximab. Une expression de pAKT était associée à une diminution du taux de réponse (9 contre 58%,  $p=0,004$ ), de la SSP (2,3 contre 9,2 mois,  $p<0,0001$ ) et de la SG (6,1 contre 26,7 mois,  $p<0,0001$ ). Il en était de même en cas d'expression de pMAPK en terme de taux de réponse (10 contre 47,  $p=0,002$ ), de SSP (2,3 contre 8,6 mois,  $p=0,0004$ ) et de SG (7,8 contre 26 mois,

p=0,0004) (Scartozzi et al., 2012). Ceci pourrait expliquer le fait que des patients sans mutation *KRAS* ne répondent pas au traitement par cetuximab. Dans cette population, les voies de signalisation MAPK et PI3K sont activées par un autre mécanisme que les mutations *KRAS*.

Les mécanismes possibles d'activation de ces voies pourraient être les mutations au niveau des gènes *BRAF* et *PIK3CA*. Ainsi, un patient de notre série présente une mutation *BRAF*, et il s'agit du patient pour lequel le niveau de phosphoprotéine MEK est le plus élevé. Le gène *BRAF* est muté dans 9 à 11% des cancers colorectaux (Deng et al., 2004). Plusieurs études ont étudié le rôle des mutations de *BRAF* dans la résistance au cetuximab dans le CCR. (Benvenuti et al., 2007 ; Loupakis et al., 2009 ; De Roock et al., 2010). Une étude rétrospective de patients traités par cetuximab montre que la présence d'une mutation *BRAF* est associée à une diminution de la SSP (8 contre 31,4 semaines, p=0,001) et de la SG (6,5 contre 14,8 mois, p=0,001) (Laurent-Puig et al., 2009a). Les membres de la voie des MAPK ont été analysés au niveau moléculaire. Ainsi d'autres mutations du gène *KRAS*, au niveau des codons 61 et 146 semblent associées à un manque de réponse et une plus faible SSP en cas de traitement par cetuximab (Loupakis et al., 2009). Un gène de la famille Ras, le gène *NRAS*, semble aussi un candidat parmi les biomarqueurs de réponse au cetuximab. Une mutation de *NRAS* est rapportée dans 3 à 5% des CCR (Lin et al., 2011). Ainsi, une mutation de *NRAS* semble associée à une diminution du taux de réponse au traitement par cetuximab (7,7 contre 38,1%, p=0,0012). Ces dernières mutations sont rares, et peuvent avoir un intérêt dans la recherche de facteurs prédictifs de réponse aux anticorps anti-EGFR, notamment dans le cas de tumeurs *KRAS* sauvages.

Concernant les mutations *PIK3CA*, 4 de nos patients présentaient ce type de mutation, mais il n'existait pas de profil particulier d'expression des phosphoprotéines dans cette population. Dans le cancer colorectal, une mutation de *PIK3CA* est trouvée dans 32% des cas (Samuels et al., 2004). Le rôle pronostique d'une mutation du gène *PIK3CA* au niveau de l'exon 9 ou 20, reste débattue. Une étude récente comprenant 1170 patients atteints d'un cancer rectal, ne montre pas de différence entre la présence d'une mutation et le profil sauvage. Néanmoins, il existait un effet néfaste lorsqu'une double mutation était établie, sur les exons 9 et 20 (Liao et al., 2012). Par ailleurs, la présence d'une mutation de l'exon 20 de *PIK3CA* semble corrélée à une diminution du taux de réponse et de la survie en cas de traitement par cetuximab (De Roock et al., 2010). En dehors des mutations de *PIK3CA*, un autre mécanisme peut être responsable d'une activation de la voie PI3K. Il s'agit de la perte d'expression de PTEN, phosphatase responsable du passage de la forme PIP3 en PIP2, et qui s'oppose à l'activation de la voie PI3K. Plusieurs études dans le CCR ont étudié l'influence des mutations de *PIK3CA* et/ou la perte d'expression de PTEN sur la réponse au cetuximab (Perrone et al., 2009 ; Frattini et al., 2007 ; Mao et al., 2011 ; Sartore-Bianchi et al., 2009 ; Negri et al., 2010). Une étude préclinique s'est intéressée à l'impact d'une dysrégulation de la voie PI3K sur la sensibilité de cellules tumorales coliques au cetuximab. Les lignées cellulaires présentant une mutation activatrice de *PIK3CA* ou une perte d'expression de PTEN étaient plus résistantes au cetuximab que celles sans mutation ou avec expression de PTEN (14 contre 38,5 % d'inhibition de croissance ;  $p=0,0008$ ). L'association d'une anomalie de la voie PI3K (mutation activatrice de *PIK3CA* ou perte d'expression de PTEN) et une mutation activatrice de *KRAS* présentaient une plus grande résistance au cetuximab comparée aux cellules sans double mutation ou

perte de PTEN associée à la mutation *KRAS* (10,8 contre 38,8% d'inhibition de croissance,  $p=0,002$ ). L'activation constitutive et simultanée de RAS et la voie PI3K confère une résistance majeure au cetuximab (Jhawer et al., 2008). Une étude moléculaire a mis en évidence chez 76 patients traités par anticorps anti-EGFR, que la conservation de l'expression de PTEN et d'un statut *PIK3CA* sauvage, chez les patients *KRAS* sauvages, était associées à une augmentation de la SG (80,4 contre 32,5 semaines,  $p=0,0008$ ) (Sood et al., 2012). Cet effet de l'expression de PTEN sur la réponse au cetuximab dans le CCR est similaire à celle qui existe sur la réponse au trastuzumab dans le cancer du sein. En effet, une étude portant sur 47 patientes traitées par trastuzumab pour cancer du sein a montré que la perte d'expression de PTEN au sein de la tumeur était significativement associée à une diminution de la réponse au traitement à base de trastuzumab, par rapport à une expression normale de PTEN (Nagata et al., 2004).

Une des limites de notre étude est le fait que l'expression des phosphoprotéines a été réalisée à partir du tissu tumoral primitif alors que la réponse est étudiée sur les métastases. Des différences d'expression des phosphoprotéines ont été rapportées dans ce cas, notamment dans une étude en immunohistochimie de l'expression de l'EGFR et des phosphoprotéines p-AKT pour la voie PI3K et de p-ERK1/2 pour la voie MAPK dans un échantillon de 98 tumeurs primitives de CCR et métastases couplées. Au sein des tumeurs EGFR négatives, 74% étaient positives pour pAKT et pERK, alors que au sein des tumeurs EGFR positives, 25% étaient négatives pour pAKT et 29% négatives pour pERK. L'expression de l'EGFR en IHC n'apparaît donc pas le reflet de l'activation des voies de signalisation en aval. D'autre part, l'expression des phosphoprotéines varie de façon importante entre les tumeurs primitives et les métastases qui leur sont associées. Ainsi, l'expression de pAKT



dans les tumeurs primitives est passée de positif à négatif dans les métastases dans 16% des cas, et de négatif à positif dans 13% des cas. L'expression de pERK dans les tumeurs primitives est passée de positif à négatif dans les métastases dans 13% des cas, et de négatif à positif dans 12% des cas. Le fait que la moitié des métastases étaient métachrones, pourrait expliquer ainsi des modifications d'expression au cours de la progression de la maladie (Scartozzi et al., 2007). L'étude de l'expression par immunohistochimie des phosphoprotéines au sein du tissu tumoral n'est pas un reflet exact de l'expression au sein des métastases. Mais l'accès au tissu métastatique n'est pas aussi aisé et aussi fréquemment réalisé en pratique courante, le diagnostic de maladie métastatique ne requérant pas le plus souvent de confirmation anatomopathologique. D'autre part, nous avons utilisé une méthode différente de l'immunohistochimie pour l'étude de l'expression des phosphoprotéines, il serait intéressant d'étudier l'expression de ces phosphoprotéines dans des couples tumeur primitive/métastase, pour déterminer si l'étude de l'expression des phosphoprotéines dans le tissu tumoral primitif peut se substituer à l'étude des métastases.

## **IV.2 Autres facteurs de réponse au cetuximab**

### **IV.2.1 Clinique : toxicité cutanée**

L'éruption cutanée au cours du traitement par cetuximab est une réaction papulo-pustuleuse de type folliculite ou acnéiforme dans les zones séborrhéiques. Ces réactions cutanées apparaissent dans un délai médian de 8 à 21 jours, sont réversibles à l'arrêt du traitement ou spontanément malgré la poursuite de celui-ci. Les mécanismes physiopathologiques ne sont pas totalement compris. Toutefois,

l'inhibition de l'EGFR semble être le mécanisme de base des effets secondaires cutanés induits par le cetuximab, car les mêmes lésions cutanées surviennent quelque soit le mécanisme d'inhibition de l'EGFR. Par contre, les inhibiteurs des autres membres de la famille EGFR, tel que le trastuzumab dirigé contre HER2, ne provoquent pas d'éruption acnéiforme.

Plusieurs études ont montré que la toxicité cutanée était corrélée à la réponse et à la survie chez les patients traités par cetuximab dans le CCR métastatique (Saltz et al., 2004 ; Cunningham et al., 2004 ; Lenz et al., 2006 ; Vallbohmer et al., 2005 ; Lievre et al., 2008 ; Stintzing et al., 2012). Comparé au statut mutationnel *KRAS*, la toxicité cutanée apparaît comme un facteur moins puissant. D'une part, il est moins discriminant que le statut *KRAS*, 23% des patients avec une toxicité cutanée grade 0-1 répondant finalement au traitement (Lievre et al., 2008). De plus, la toxicité cutanée apparaissant dans les 3 premières semaines de traitement, exposant des sujets non répondeurs à une toxicité inutile du produit. Au contraire, le statut mutationnel *KRAS* pouvant être déterminé au préalable du traitement, permet une sélection plus efficace des patients. Toutefois, chez les patients ayant peu de toxicité cutanée, il semble possible d'augmenter l'efficacité du cetuximab en augmentant les doses. Ainsi, l'étude EVEREST a comparé, chez 157 patients qui avaient une toxicité cutanée de grade  $\leq 1$  après 21 de traitement par cetuximab, le doublement de dose à 500mg/m<sup>2</sup> à la poursuite à la dose de 250mg/m<sup>2</sup>. Ce doublement de dose était accompagné d'une augmentation du grade de toxicité cutanée  $\geq 2$ , mais était par ailleurs bien toléré. D'autre part, l'augmentation de dose a permis d'améliorer le taux de réponse par rapport à la dose standard (30% contre 16% respectivement), mais sans améliorer la survie (Van Cutsem et al., 2012).

#### IV.2.2 L'EGFR : surexpression, amplification, mutation

Le premier facteur biologique étudié comme potentiel facteur prédictif de la réponse au cetuximab est l'expression protéique de l'EGFR mesurée par IHC au niveau des cellules tumorales. L'expression de l'EGFR est présente approximativement dans 60 à 80% des CRC (Nicholson et al., 2001 ; Goldstein et al., 2001), et les premiers essais réalisés chez l'homme ont été effectués en cas d'expression de l'EGFR en IHC (Saltz et al., 2004 ; Cunningham et al., 2004). L'expression de l'EGFR en IHC était même considérée comme un pré-requis nécessaire à la prescription du cetuximab selon l'AMM. Cependant, des études avaient montré un taux de réponse comparable à celui de l'étude BOND chez les patients EGFR+ chez des patients traités pour un CCR métastatique par cetuximab, mais ayant un marquage négatif pour l'EGFR, suggérant que l'expression de l'EGFR n'est pas un critère de sélection pertinent des patients pour bénéficier du cetuximab (Chung et al., 2005 ; Hebbar et al., 2006). Depuis ces résultats, l'expression de l'EGFR par IHC au niveau de la tumeur primitive ne semble pas une condition de mise sous traitement par cetuximab. L'expression de l'EGFR semble toutefois être un marqueur prédictif de réponse au cetuximab. Notamment chez les patients avec un *KRAS* sauvage (Yen et al., 2010). Le mécanisme probable intervenant est probablement l'ADCC, qui sera détaillé plus loin. Par ailleurs, il n'existe pas de correspondance stricte entre le niveau d'expression de l'EGFR de la tumeur primitive et des métastases (Scartozzi et al., 2004 ; Bralet et al., 2007), or la recherche d'expression de l'EGFR est réalisée généralement sur le tissu de la tumeur primitive.

L'hétérogénéité des récepteurs EGFR pourrait expliquer la possibilité d'efficacité du cetuximab dans les tumeurs EGFR négatives. En effet, il existe des récepteurs EGFR de haute affinité, lesquels conduisent à l'activation des tyrosines

kinases, au contraire des récepteurs de faible affinité qui ne contribuent pas de façon significative à la transduction du signal. Les récepteurs de haute affinité sont moins bien détectés par IHC, pouvant expliquer que des tumeurs EGFR négatives répondent au cetuximab. Ils semblent toutefois être exprimés par une grande partie des CCR. (Francoual et al., 2006).

Par ailleurs, la détection de l'expression de l'EGFR en IHC n'est pas standardisée entre les différentes études, et peut être obtenue par plusieurs kits commerciaux. L'utilisation de 3 kits commerciaux différents pour déterminer l'expression de l'EGFR, à partir de 232 échantillons de tissu tumoral de CCR métastatiques amis en évidence que le pourcentage de cas positifs variait de 93 à 75% avec un seuil de cellules positives à 1%, de 80 à 61% avec un seuil de cellules positives à 5%, et de 72 à 48% avec un seuil de cellules positives à 10%. Une forte concordance existait entre les 3 tests lorsque l'immunomarquage était de forte intensité, entre 30 et 34% des cas présentaient un marquage 3+ pour les différents kits (Penault-Llorca et al., 2006).

D'autres marqueurs prédictifs potentiels concernant l'EGFR ont été recherchés, en particulier la présence d'une amplification du gène et d'une mutation activatrice de son domaine tyrosine kinase dont l'existence avait été montrée dans les adénocarcinomes pulmonaires. Concernant la fréquence de l'amplification de l'EGFR dans le CCR, plusieurs travaux ont rapportés des résultats divergents (Moroni et al., 2005 ; Shia et al. 2005), pouvant être expliqués par la multiplicité des techniques utilisées. En plus des divergences concernant la fréquence, des résultats contradictoires existent concernant la relation existant entre la présence d'une amplification génique de l'EGFR et la réponse au cetuximab. Plusieurs études rapportent une meilleure réponse et/ou survie sous cetuximab en cas d'amplification

génique (Moroni et al., 2005 ; Lievre et al., 2006 ; Cappuzzo et al., 2008a ; Cappuzzo et al., 2008b ; Personeni et al., 2008 ; Laurent-Puig et al., 2009a). D'autres études ne trouvent pas de corrélation entre le nombre de copies de gènes de *l'EGFR* et la réponse au cetuximab (Lenz et al., 2006 ; Vallbohmer et al., 2005 ; Italiano et al., 2008).

Des mutations somatiques dans la région du gène de *l'EGFR* codant pour le domaine tyrosine kinase du récepteur (exons 18 à 21) ont été mises en évidence dans les CBNPC. Plusieurs études ont montré un lien existant entre la présence de ces mutations et la réponse aux TKI (Tsao et al., 2005 ; Paez et al., 2004 ; Shigematsu et al., 2005). Dans le CCR, la présence d'une mutation au niveau du domaine TK du gène de *l'EGFR* est peu fréquente (Barber et al., 2004 ; Moroni et al., 2005 ; Vallbohmer et al., 2005). Les TKI agissent au niveau du domaine TK, où la dérégulation entraîne l'activation du récepteur et des voies de signalisation en aval, expliquant l'efficacité des TKI dans les tumeurs mutées dans le domaine TK du gène de *l'EGFR*, et l'absence de réponse au cetuximab pour les mêmes tumeurs, car ils agissent en amont de la dérégulation. Une nouvelle mutation de *l'EGFR* S492R vient d'être identifiée, codant pour la partie extracellulaire du récepteur. Elle apparaît en cours de traitement par cetuximab, rendant la tumeur résistante au cetuximab, alors qu'elle répond secondairement au panitumumab (Montagut et al., 2012).

### **IV.2.3 Amphiréguline et épiréguline**

L'amphiréguline et l'épiréguline, deux ligands de *l'EGFR*, sont codés par les gènes *AREG* et *EREG*. Une forte expression de ces 2 gènes, dans des tumeurs coliques traitées par cetuximab est associée à une augmentation du contrôle de la

maladie et une augmentation de la SSP (Khambata-Ford et al., 2007 ; Jacobs et al., 2009). L'expression de ligands de l'EGFR au sein d'une tumeur peut être le reflet de la stimulation autocrine/paracrine de l'EGFR dans la croissance tumorale, pouvant expliquer la sensibilité plus importante de ces tumeurs exprimant fortement ces gènes, à des thérapeutiques tel que le cetuximab ciblant la voie de l'EGFR. Par ailleurs, l'expression de EREG est un facteur de mauvais pronostic, associé à une diminution de la survie (Kuramochi et al.,2012).

#### **IV.2.4 Facteurs immunologiques et réponse au cetuximab : ADCC**

L'ADCC (antibody dependent cell mediated cytotoxicity) est un mécanisme immunitaire dans lequel des anticorps spécifiques d'un antigène dirigent les cellules immunitaires effectrices de l'immunité innée pour détruire les cellules cancéreuses exprimant l'antigène cible. Ceci ne concerne que les anticorps de type IgG1, et dans le cas des Ac anti-EGFR, seulement le cetuximab, le panitumumab étant un anticorps de type IgG2. Le cetuximab est un anticorps entier comportant une portion Fc fonctionnelle, dotée de propriétés thérapeutiques potentielles. Cette région est capable de se lier à des récepteurs pour la portion Fc des IgG (FcγR) exprimés sur des cellules cytotoxiques telles que des lymphocytes NK ou des macrophages. Il existe 3 récepteurs activateurs : FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A), et FcγRIIIA (CD16A) ; et un récepteur inhibiteur, FcγRIIB (CD32B). Les cellules NK sont les principaux effecteurs de l'ADCC, et expriment préférentiellement FcγRIIIA, qui a la plus forte affinité parmi les récepteurs (Shuptrine et al., 2012). Le mécanisme des anticorps anti-EGFR a été mis en évidence par plusieurs études. Une étude in vitro qui a testé l'efficacité d'un anticorps monoclonal anti-EGFR et une forme bivalente

des fragments Fab de cet anticorps. Après incubation de cellules *in vivo* sur souris nude avec xénogreffe de cellules tumorales épithéliales vulvaires exprimant l'EGFR, l'efficacité de l'anticorps entier était supérieure par rapport au sous fragment bivalent F(ab)<sub>2</sub>, suggérant un mécanisme inhibiteur immunitaire supplémentaire de la croissance tumorale de l'anticorps anti-EGFR, en plus du mécanisme de blocage de l'EGFR (Fan et al., 1993). Le mécanisme d'ADCC est proportionnellement plus important en cas d'expression de l'EGFR (Kawaguchi et al., 2007 ; Hara et al., 2008).

Le récepteur FcγR, liant le fragment Fc des IgG, est codé par le gène *FCGR*. Deux polymorphismes fonctionnels de ce gène, pouvant modifier les fonctions de destruction des cellules immunitaires effectrices, ont été identifiés : FCGR2A-H131R et FCGR3A-V158F (Zhang et al., 2007). Les polymorphismes FCGR2A-H131R H/H (Histidine) et FCGR3A-V158F V/V (valine) sont associés à une SSP plus longue que les autres polymorphismes, même chez les patients mutés *KRAS*. En analyse multivariée, le statut *KRAS* et le polymorphisme de *FCGR* sont des facteurs de risque indépendants (Bibeau et al., 2009). A l'opposé, des études n'arrivent pas à retrouver cet effet du polymorphisme de FCGR (Paez et al., 2010 ; Park et al., 2012).

### **IV.3 Vers de nouvelles thérapeutiques : au delà du cetuximab**

Nous avons vu précédemment que des patients sans mutation *KRAS* ne répondaient pas au cetuximab, et que des patients mutés *KRAS* étaient stables sous traitement. Dans notre étude, nous avons mis en évidence que l'activation des voies de signalisation MAPK et PI3K était associée à une diminution de la survie dans le CCR métastatique traité par cetuximab, indépendamment du statut mutationnel *KRAS*. On peut émettre l'hypothèse que l'ajout de thérapeutiques visant ces deux

voies de signalisation pourrait améliorer la réponse et la survie des patients ne répondant pas au cetuximab. Les cibles possibles de ces thérapeutiques peuvent être PI3K et mTOR, pour la voie PI3K d'une part, et MEK pour la voie MAPK d'autre part.

Concernant la voie MAPK, des inhibiteurs de MEK sont en cours d'essais thérapeutiques. Un essai de phase 2 a comparé un inhibiteur de MEK1/2, AZD6244 (ARRY-142886) à la capécitabine chez des patients avec un CCR métastatique. Il n'a pas été mis en évidence de différence en terme de réponse et de SSP (Bennouna et al., 2011). Dans les études précliniques, la présence d'une mutation *KRAS* ou *BRAF* ne suffisait pas à prédire la réponse à ce composé. Les cellules résistantes avaient une absence ou une faible expression de pERK, ou avait une coactivation de la voie PI3K en plus de l'activation de la voie MAPK. Ce dernier point suggère une possible efficacité d'une association entre un inhibiteur de MEK et un inhibiteur de la voie PI3K (Balmano et al., 2009). Ainsi, à l'étape préclinique, une association de ce même inhibiteur de MEK, AZD6244, avec un inhibiteur de la voie PI3K, BEZ235, a montré une régression tumorale mais de courte durée (Migliardi et al., 2012). Une autre étude s'est intéressée à la relation entre la voie MAPK et un autre inhibiteur de MEK. A l'opposé de la précédente molécule, la réponse au traitement était liée à la présence d'une mutation *KRAS* ou *BRAF*, et non corrélée à l'expression de ERK (Yeh et al., 2009). D'autres travaux sont nécessaires afin de mieux comprendre le mécanisme de ces nouveaux composés et de trouver les bons marqueurs prédictifs de réponse.

Dans la voie MAPK, d'autres thérapeutiques semblent être efficaces. Ainsi, une molécule multicible, ciblant entre autre *BRAF*, le regorafenib, a montré son efficacité en phase 3 contre placebo, chez des patients avec un CCR multi-traité. En



effet, la SG était améliorée dans le groupe regorafenib (6,4 contre 5 mois), ainsi que la SSP (HR = 0,493 (p<0,000001) (Grothey et al., 2012). Un autre inhibiteur de BRAF, le *vemurafenib*, montre une activité en phase préclinique sur les cellules et tumeurs présentant la mutation *BRAF* V600E, et est très actif dans le mélanome. La survie était augmentée par l'association à d'autres thérapeutiques, tel que l'erlotinib (Yang et al., 2012). Lors du blocage de *BRAF*, un rétrocontrôle entraîne une activation de l'EGFR. Une efficacité plus importante de verumafenib dans le melanome que dans le CCR, peut être probablement secondaire au fait que l'EGFR est exprimé dans le CCR et peu dans le mélanome, Une association verumafenib-anti-EGFR paraît un bon choix de traitement dans les CCR mutés *BRAF* (Prahallad et al., 2012).

Concernant la voie PI3K, plusieurs cibles thérapeutiques existent : mTOR et PI3K. La protéine mTOR est une kinase de la voie PI3K qui active p70S6K. Les inhibiteurs de mTOR sont des analogues de la rapamycine et agissent par fixation de l'immunophiline FK506/rapamycine binding proteine qui se lie à mTOR et inhibe ses fonctions. Dans une autre étude de phase I, RAD-001 a montré son efficacité dans le CCR métastatique, avec une réponse partielle (5,3 mois) (Tabernero et al., 2008). Plus récemment, l'association everolimus et lapatinib, TKI inhibant l'EGFR et HER-2, a montré une synergie dans la réponse sur modèle animal de CCR muté *KRAS* (Chu et al., 2012).

Une autre possibilité thérapeutique est la stimulation de l'ADCC induite par le cetuximab. Nous avons vu précédemment que l'ADCC était un effet à prendre en compte dans l'action du cetuximab. Il pourrait expliquer la non progression de patients présentant une mutation *KRAS*. Un des moyens d'activer l'ADCC est de modifier la structure de l'anticorps. Ainsi, une nouvel anticorps anti-EGFR, le GA201,

a une glycosylation de la région Fc, entraînant une augmentation de l'affinité de l'anticorps pour le récepteur de Fc sur les cellules immunitaires. Ce nouvel anticorps a montré une efficacité en essai de phase 1, dont 1 réponse chez un patient avec une mutation *KRAS* (Paz-Ares et al., 2012).

Une solution pour augmenter l'efficacité des anticorps anti-EGFR serait de les associer aux TKI. Ainsi, une étude s'est intéressée à l'effet de l'association cetuximab-gefitinib dans un modèle préclinique. Cette association permettait d'augmenter le taux et la durée de rémission. L'inhibition de l'EGFR, des voies MAPK et PI3K était plus intense (Matar et al., 2004). L'association cetuximab et erlotinib a été testée en phase 2 chez 50 patients. Le taux de réponse était de 31%, avec une SSP médiane de 4,6 mois. Par contre, il n'existait aucune réponse chez les patients présentant une mutation *KRAS*. En effet, cette association ne cible pas la voie de l'EGFR en aval de *KRAS*, et semble donc mieux adaptée au traitement des tumeurs sauvages (Weickhardt et al., 2012 ; Laurent-Puig et al., 2012).

Nous avons mis en évidence dans notre étude que l'activation des voies de signalisation en aval de l'EGFR est un facteur de résistance au cetuximab, indépendamment du statut mutationnel *KRAS*. Mais le développement des thérapies ciblées sur des éléments de ces voies de signalisation permettrait de restaurer une réponse chez les patients ayant une activation des voies de signalisation. La recherche de cette activation par la méthode du Bioplex permettrait de sélectionner les patients susceptibles de bénéficier de ces thérapies ciblées.

## **Partie 3**

# **LA RECHERCHE DE MUTATIONS DANS L'ADN CIRCULANT**

## **I Contexte de l'étude**

Précédemment, nous avons vu l'importance de l'étude des mutations au sein du tissu tumoral, afin de rechercher des facteurs pronostiques et prédictifs de réponse aux thérapies ciblées. La qualité et l'accessibilité du tissu tumoral peut être problématique, et d'autres sources d'ADN tumoral sont actuellement en cours d'étude. L'ADN circulant fait partie de ces sources de matériel génétiques utilisables.

### **I.1 l'ADN circulant**

L'ADN circulant (ADNcir) correspond à de l'ADN double brin qui peut être isolé à partir du plasma et du sérum de patients ou de sujets sains. Il a été pour la première fois décrit en 1947 par Mandel et Métais. Le mécanisme du relargage de l'ADNcir dans la circulation est controversé : il pourrait provenir de l'apoptose et/ou de la nécrose des cellules cancéreuses, mais aussi de l'apoptose des cellules normales. L'ADNcir est constitué à la fois d'ADN dérivé de la tumeur mais aussi d'ADN non tumoral, provenant de la dégradation de cellules situées dans l'environnement immédiat de la tumeur, secondaire à la croissance tumorale (Schwarzenbach et al., 2011). Il est possible de faire la distinction entre les deux modèles de mort cellulaire : l'apoptose produit des fragments de 180 bp ou leurs multiples, de petite taille, alors que la nécrose donne des fragments de plus grande taille. Il a été montré par plusieurs équipes que l'ADNcir avait une plus grande intégrité (fragment de plus grande taille, donc par un mécanisme nécrotique) chez les patients atteints d'un cancer que les sujets sains, chez qui l'apoptose serait le principal moyen de relargage de l'ADNcir (Board et al., 2008b ; Umetani et al., 2006). Une autre théorie

pour expliquer le relargage du ADNcir dans la circulation est la phagocytose des cellules tumorales nécrotiques qui libère ensuite de petits fragments d'ADN. Les cellules du stroma tumoral ainsi que les cellules inflammatoires impliquées dans le processus tumoral, peuvent elles aussi être impliquées dans ce phénomène, expliquant la part non-tumorale de l'ADNcir (Jahr et al., 2001 ; Diehl et al., 2005). Un autre mécanisme pourrait être le relargage actif de l'ADNcir par les cellules elles-mêmes. En effet, dans une expérience in vitro, de l'ADN est retrouvé dans le milieu de culture cellulaire sans que la mort cellulaire ne semble en être la cause (Anker et al., 1975). Il circule majoritairement sous la forme de nucléosomes, permettant de protéger l'ADN de la dégradation dans le plasma. De plus ces nucléosomes sont en faveur de l'origine apoptotique du relargage de l'ADNcir dans la circulation (Thierry et al., 2010 ; Jahr et al., 2001). L'élimination de cet ADNcir de l'organisme se fait par l'action de nucléases et par clairance rénale et hépatique (Hisazumi et al., 2004).

L'ADNcir pourrait avoir un rôle de messenger, en transmettant de façon horizontale de l'information génétique tumorale dans d'autres cellules de l'organisme. Ceci est l'hypothèse de la « génométastase », correspondant à une transfection génique de matériel tumoral dans les cellules souches de l'organisme (Goessl et al., 2003 ; Garcia-Olmo et al., 2010).

L'origine tumorale de l'ADNcir peut être établie de manière indirecte par un certain nombre d'éléments. Tout d'abord, la concentration d'ADNcir est plus élevée chez les patients atteints d'un cancer que chez les sujets sains, avec une moyenne de 180ng/ml de plasma versus 13mg/ml respectivement (Leon et al., 1977). Mais il existe d'autres situations physiologiques de fortes concentrations d'ADNcir tels que l'infarctus du myocarde (Chang et al., 2003), les traumatismes (Lo et al., 2000) et les maladies inflammatoires (Zhong et al., 2007). Dans différents types de cancer, la

quantité d'ADNcir est corrélée à la croissance tumorale et à la progression de la maladie (Goebel et al., 2005). Ainsi, une étude a montré une corrélation entre la quantité d'ADNcir et la présence de métastases chez des patients atteints d'un CCR (Guadalajara et al., 2008).

Un argument direct quant à l'origine tumorale de l'ADNcir est la possibilité de détecter des altérations génétiques présentes dans la tumeur initiale, à partir de l'ADNcir. De nombreuses études ont rapporté la détection de mutations, d'altérations des microsatellites, mais aussi de modifications épigénétiques à partir de l'ADNcir dans de nombreux types tumoraux. Les mutations qui peuvent être détectées dans l'ADNcir concernent des oncogènes tels que le gène *KRAS* dans le CCR, le CBNPC et le cancer pancréatique (Diehl et al., 2008b, Gautschi et al., 2007, Chen et al., 2010), le gène *EGFR* dans le CBNPC (Kuang et al., 2009), le gène *PIK3CA* dans le cancer du sein (Board et al., 2010), le gène *BRAF* dans le mélanome (Board et al., 2009a), mais aussi des gènes suppresseurs de tumeurs tels que le gène *p53* dans le cancer du sein (Shao et al., 2001). Une instabilité microsatellite a été détectée dans l'ADNcir de différents types tumoraux, tels que les tumeurs ORL (Nawroz et al., 1996 ; Kakimoto et al., 2008). La détection de méthylation a été effectuée dans différentes tumeurs, tels que le cancer du sein, le CCR, le cancer de la prostate (van der Auwera et al., 2009 ; Lee et al., 2009 ; Cortese et al., 2012).

## **I.2 l'ADN circulant : source d'ADN tumoral**

L'intérêt principal d'étudier l'ADNcir est de pouvoir avoir accès à du matériel génétique tumoral d'une manière peu invasive comparativement aux biopsies tumorales. A l'heure des thérapies ciblées, l'obtention de matériel tumoral biopsique

est devenu une étape critique dans le développement et la compréhension des mécanismes de résistance ou de sensibilité aux thérapies anticancéreuses. Ceci est particulièrement vrai pour les essais cliniques précoces dans lesquels l'obtention de nouvelles biopsies tumorales, de la tumeur primitive ou des métastases, est actuellement de plus en plus demandée et pose un certain nombre de problèmes éthique et logistique, même si faisable en pratique, comme démontré entre autres par l'essai BATTLE dans le CBNPC (Kim et al., 2011 ; Roychowdhury et al., 2011).

Il existe théoriquement plusieurs avantages à utiliser l'ADNcir comme source d'ADN tumoral : son obtention est peu contraignante pour le patient, simple pour le personnel médical (prise de sang), répétable au cours du temps et des différents traitements. Cependant, des précautions doivent être prises concernant le mode de recueil, d'isolation et de conservation, afin de garantir la qualité du matériel génétique. La quantité d'ADNcir issu du sérum est plus importante que dans le plasma, mais cette augmentation est due à la lyse des leucocytes lors du phénomène de coagulation, faisant préférer le plasma pour l'étude de l'ADNcir (Board et al., 2008b ; Lo et al., 1998). De plus, le temps de traitement de l'échantillon de sang est un paramètre crucial pour la qualité et la quantité de l'ADNcir qui sera isolé, argument supplémentaire en faveur du plasma par rapport au sérum (Xue et al., 2009). Enfin, le mode de conservation du plasma et de l'ADNcir est crucial, même si une dégradation du matériel existe au cours du temps (Sozzi et al., 2005).

Ainsi, l'ADNcir pourrait représenter un complément de choix dans l'analyse génétique des tumeurs, surtout dans le cas des essais cliniques de phase précoce ou dans le suivi d'un traitement par thérapies ciblées, par l'obtention d'un matériel susceptible de refléter plus justement la maladie métastatique en terme d'anomalies génétiques, facile d'accès et d'analyse, répétable, et tolérable pour le patient.





## **II. Objectifs de l'étude**

### **II.1 Hypothèse de travail**

L'unité de développement thérapeutique (Drug Development Unit) du Royal Marsden Hospital à Sutton en Grande-Bretagne, en association avec l'unité de recherche sur les biomarqueurs dans le cancer (Cancer Biomarker Group) à Institute of Cancer Research, avait comme projet d'optimiser la réponse au traitement en allouant une molécule au patient qui présente une altération moléculaire ciblée par cette molécule.

Dans ce but, Sequenom®, plateforme de spectrométrie de masse à haut débit, a été utilisé pour la caractérisation moléculaire de ces patients, en utilisant le panel de recherche de mutation Oncocarta (version 1.0; Sequenom, San Diego, CA). Ce panel utilise une technologie de génotypage SNP (single nucleotide polymorphism) pour l'analyse en multiplex de 238 mutations simples ou complexes au sein de 19 oncogènes, en minimisant la quantité de matériel génétique nécessaire et en augmentant la sensibilité de détection (van Puijenbroek J Mol Diag 2005). Ce procédé a déjà été utilisé avec succès pour la recherche de mutation dans du tissu tumoral fixé en paraffine (Fumagalli et al., 2010; MacConaill et al., 2009). Dans ce projet, il a été décidé d'étudier l'ADNcir comme source d'information d'anomalie moléculaire en plus du tissu tumoral. Le travail présenté est l'étude de faisabilité de détection de mutation par la technique du Sequenom, avec le panel Oncocarta v1.0, à partir de l'ADNcir, et la concordance avec les données du tissu tumoral.

## II.2 La technique du Sequenom

L'analyse d'un échantillon par le système du spectromètre de masse MALDI-TOF est réalisée à partir d'un mélange d'ADN et de matrice en solution. Ce mélange est distribué en petite quantité sur un support pour permettre sa cristallisation. Le cristal est ensuite frappé par un laser pour ioniser l'échantillon et permettre à des ions d'ADN générés par cette réaction, de « voler » dans un tube sous l'action d'un champ électrique, jusqu'à un détecteur. Le temps de vol de l'ion d'ADN dépend de sa masse, les fragments légers « volant » plus rapidement, permettant leur séparation selon leur masse. Les nucléotides A, C, G et T ayant une masse différente, leur nature peut être identifiée par le spectromètre de masse.

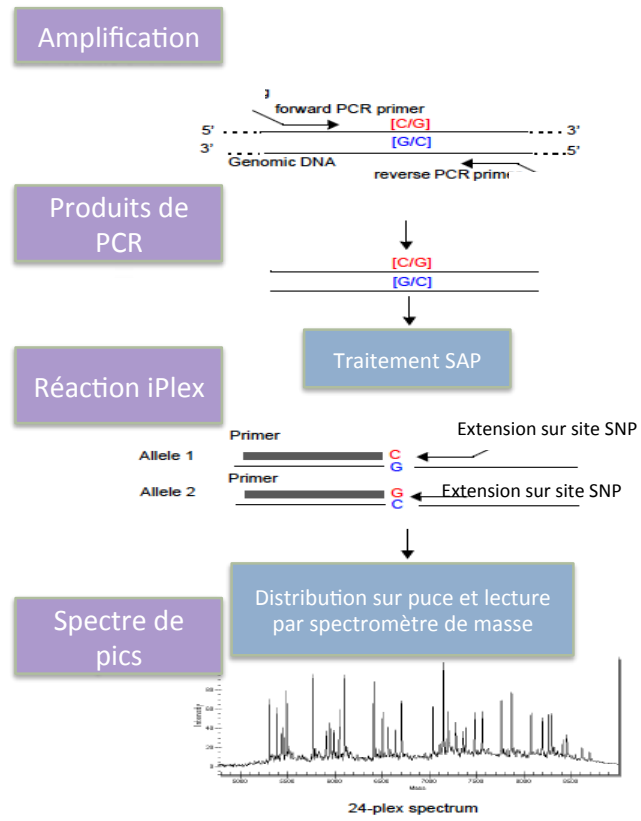
Fort de ce principe, une méthode de détection de mutations à type de substitutions, insertions, délétions et polymorphisme appelée iPLEX, a été développée. Elle comprend plusieurs étapes réalisées dans une plaque de 384 puits. Une première étape consiste en une amplification de la région d'ADN d'intérêt par réaction de PCR. A partir des produits de PCR, la seconde étape correspond à l'élimination des déoxynucléotides (dNTP) et des amorces non incorporées lors de la réaction de PCR. Cette étape est indispensable pour éviter toute interaction lors de la réaction d'extension. Pour ce faire, est utilisée une phosphatase alcaline (SAP pour shrimp alkaline phosphatase). La troisième étape consiste en une réaction d'extension d'amorces, dont la séquence précède d'un nucléotide la zone de SNP étudiée. Lors de la réaction de PCR d'extension sont mélangés ces primers et des didéoxynucléotides (ddNTP) et une sequenase particulière. La réaction d'extension s'arrête après l'incorporation du premier ddNTP à partir du primer, juste au niveau du site de SNP étudié. En effet, l'absence d'un groupement hydroxyl sur ces ddNTP empêche l'incorporation d'une nouvelle base à la suite. Une quatrième étape

correspond à l'élimination de sels de sodium et de potassium, afin de réduire le bruit de fond causé par ces sels. Une résine spécifique est donc ajoutée directement au produit d'extension. La suite de la procédure consiste en une distribution d'un volume de l'ordre d'une dizaine de nanolitres du produit de la réaction d'extension, sur une puce (SpectroChip). Une fois la distribution réalisée, le SpectroChip est introduit dans le spectromètre de masse pour que la réaction initialement décrite se produise. Les primers sont donc étendus par un seul ddNTP. Pour un même primer, la différence de masse entre 2 produits d'extension est due à la nature du nucléotide constituant le ddNTP incorporé lors de la réaction d'extension, ce que le spectromètre de masse pourra déterminer par des temps de vols différents entre les produits. La traduction de ces résultats se fait sous la forme de pics, correspondant à des temps de vols donc des masses différentes. Ainsi, un primer sans réaction d'extension à une masse déterminée, traduite par un premier pic. Si un ddNTP de type ddC est incorporé, l'ensemble primer-ddC sera détecté par sa masse, traduit par un pic de masse supérieure à celle du primer non étendu. Si un ddNTP de type ddG est quant à lui incorporé, de masse supérieure au ddC, l'ensemble primer-ddG de masse supérieure au complexe précédent sera détecté par un 3<sup>ème</sup> pic. Ce système permet donc la détermination du site SNP. Pour la détermination de délétions et insertions, le même système est utilisé, mais l'interprétation des résultats nécessite le plus souvent 2 ou 3 primers, pour la détermination des sites modifiés par ces changements de cadre de lecture (Edwards et al., 2005).

Du fait de la précision dans la détermination de la masse par ce système, plusieurs réactions intéressant des régions différentes peuvent être réalisées dans un même puits, permettant une analyse en multiplex. Oncocarta v1.0 est un kit de 24 mélanges d'amorces regroupées en multiplex, préparés et validés. Ce kit permet la

détection de 238 mutations simples et complexes parmi 19 gènes : *ABL1*, *AKT1*, *AKT2*, *BRAF*, *CDK4*, *EGFR*, *ERBB2*, *FGFR1*, *FGFR3*, *FLT3*, *JAK2*, *KIT*, *MET*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *PDGFA*, *PIK3CA* et *RET*. Ce kit avait été validé sur des échantillons tumeurs de CCR inclus en paraffine (Fumagalli et al., 2010).

Figure 5 : schéma de la réaction iPlex (source Sequenom®)



### III. Résultats

Les résultats de ce travail sont acceptés pour publication dans Plos One en 2012 dont voici la référence dans PubMed:

Perkins G, Yap TA, Pope L, Cassidy AM, Dukes JP, Riisnaes R, Massard C, Cassier PA, Miranda S, Clark J, Denholm KA, Thway K, Gonzalez De Castro D, Attard G, Molife LR, Kaye SB, Banerji U, de Bono JS. (2012). Multi-purpose utility of circulating plasma DNA testing in patients with advanced cancers. *PLoS One*. 2012;7(11):e47020. doi: 10.1371/journal.pone.0047020. Epub 2012 Nov 7.

En résumé, nous avons étudié la faisabilité, la sensibilité et la spécificité d'une technique de spectrométrie de masse (Sequenom®) pour détecter des mutations (238 mutations parmi 19 oncogènes) à partir du tissu tumoral et de l'ADNcir de 105 patients ayant un cancer avancé. La concentration médiane de l'ADNcir était de 17ng/ml de plasma (0,5-1600), soit 3 fois le niveau chez les volontaires sains. En analyse multivariée, la concentration de l'ADNcir, l'albumine et l'état général étaient des facteurs prédictifs indépendants de la survie globale des patients. De plus, il existait une concordance élevée des statuts mutationnels (*KRAS*, *BRAF* et *PIK3CA*) entre le tissu tumoral et l'ADNcir dans plusieurs types tumoraux (CCR, sein, mélanome) : un taux de concordance de 70% pour le gène *KRAS* et de 100% pour le gène *BRAF* ont été trouvés dans le CCR. Notre étude suggère que l'analyse de l'ADNcir pourrait être un matériel utilisable pour la recherche de mutations, en complément ou en remplacement du tissu tumoral.

## **IV. Discussion**

Notre étude a démontré pour la première fois la faisabilité de détecter de multiples mutations d'oncogènes en utilisant le panel Oncocarta, à partir de l'ADNcir et du tissu d'archive. Nous avons aussi montré que le taux d'ADNcir était en général plus élevé chez les patients atteints d'un cancer avancé, en comparaison aux sujets sains. Enfin, l'ADNcir apparaît comme un facteur pronostique indépendant.

### **IV.1 L'ADN circulant : biopsie « liquide » dans le cancer du colon**

Chez les patients atteints de cancer, l'ADNcir peut être détecté en quantité et avec une fréquence variables en fonction des différentes études. La signification biologique de l'ADNcir et son impact clinique restent encore débattus malgré plusieurs avancées récentes. La détection de cet ADNcir est cependant considérée depuis longtemps comme ayant un intérêt clinique potentiel pour le suivi des traitements en oncologie (Alix-Panabieres et al., 2012). La possibilité d'isoler, de quantifier et d'étudier l'ADNcir dans le sang des patients permet d'imaginer plusieurs types d'applications en recherche clinique et fondamentale et pourrait modifier différents domaines de la prise en charge des patients atteints de cancer. Notre étude a montré que le taux d'ADNcir était significativement plus élevé chez les patients que chez les volontaires sains. En effet, la concentration médiane chez les patients était de 17 ng/ml de plasma, avec un taux plus faible chez les patients atteints de mélanome (7 ng/ml) que chez les patients avec un cancer de la prostate (53 ng/ml).

Avec toutes ces caractéristiques, l'ADNcir pourrait être utilisé comme un complément au tissu tumoral pour l'analyse génétique des tumeurs. En effet, cette analyse est actuellement réalisée à partir du tissu tumoral primitif d'archive, soit la pièce opératoire, soit très fréquemment des biopsies souvent de petite taille. Ce matériel génétique est limité et épuisable, ce d'autant qu'il s'agit de biopsies. Alors que dans la plupart des cancers, de nombreux tests génétiques seront demandés en routine dans un futur proche, afin de déterminer des facteurs prédictifs de réponse aux TMC, il paraît indispensable de développer une technique pour avoir accès à du matériel tumoral tout le long de la maladie cancéreuse.

Les rôles potentiels de l'ADNcir sont multiples. Il peut être un marqueur pronostique, un marqueur prédictif de réponse et un biomarqueur pharmacodynamique notamment des TMC. Il peut aussi mettre en évidence de nouvelles cibles afin de personnaliser le traitement, permettre la sélection de patients pour un traitement adjuvant, surveiller la réponse thérapeutique. Il peut enfin servir de « biopsie liquide », en complément du tissu tumoral pour une aide diagnostique, étudier le profil moléculaire de la tumeur, servir de marqueur de substitution à la tumeur dans le suivi du patient. Un dernier rôle de l'ADNcir est de participer à la compréhension de la biologie de la tumeur (de Mattos-Arruda et al., 2011).

Dans le CCR, l'ADNcir semble un bon candidat comme marqueur pronostique. En effet, le taux élevé d'ADNcir semble corrélé à la masse tumorale mais aussi à la survie des patients (Schwarzenbach et al., 2008 ; Lecomte et al., 2002). Par ailleurs, un taux d'ADNcir qui augmente après une chirurgie curative est un marqueur de rechute, de même que la détection de mutations telles que les mutations dans le gène *KRAS* (Frattoni et al., 2008). Dans une autre étude, l'ADNcir semble être un bon outil de surveillance de la récurrence métastatique des CCR, car les patients



présentant un taux détectable d'ADNcir en pré et post-opératoire avaient un risque plus important de récurrence. De plus, l'ADNcir était plus sensible que le taux d'ACE, marqueur standard aujourd'hui dans la surveillance des patients opérés d'un CCR (Diehl et al., 2008a). D'autre part, de nombreux exemples existent dans la littérature concernant la possibilité de détecter des mutations dans l'ADNcir, présentes dans la tumeur primitive colique, démontrant l'origine tumorale de l'ADNcir dans le CCR (Anker et al., 1997 ; Diehl et al., 2008b ; Frattini et al., 2008 ; Lefebure et al., 2010 ; Ryan et al., 2003 ; Sorenson et al., 2000 ; Spindler et al., 2012 ; Su et al., 2008 ; Trevisiol et al., 2006 ; Yen et al., 2009).

Cependant, l'étude du ADNcir se heurte à des problèmes techniques. La concentration d'ADNcir est faible, de l'ordre de dizaines de nanogrammes par ml de plasma, nettement inférieur à la concentration d'ADN récupéré après extraction de la tumeur, même si cette concentration est plus élevée chez les patients atteints d'un cancer. D'autre part, la grande majorité de l'ADNcir est composé d'ADN « normal » par rapport à l'ADN tumoral qui est présent sous forme de petits fragments. Ces 2 conditions particulières nécessitent l'utilisation de techniques sensibles quantitatives et qualitatives, que ce soit pour la mesure de la concentration de l'ADNcir, mais aussi pour la recherche d'altérations moléculaires. Dans notre étude, afin de tester la sensibilité de la méthode, nous avons réalisé des dilutions d'ADN extraits de la lignée cellulaire HCT116, présentant la mutation *KRAS* G13D, montrant que la mutation était toujours détectable à une concentration de 40ng/ml. Par ailleurs, aucune mutation n'a été détectée dans l'ADNcir des volontaires sains. Enfin, nous avons réalisé la dilution de l'ADNcir d'une patiente atteinte d'un cancer du sein et présentant une mutation *PIK3CA*. Celle-ci est restée détectable jusqu'à une concentration de 2,5ng/ml de plasma.

De plus, il est indispensable de poser la question de la place de l'ADNcir dans la prise en charge des patients atteints de cancer au regard du développement d'autres biomarqueurs moléculaires (comme les CTCs, ou l'imagerie métabolique), et de définir les conditions qui permettront peut-être de l'implémenter dans la pratique clinique.

## **IV.2 Les principales méthodes d'étude de l'ADN circulant**

Un des principaux défis des années à venir est de déterminer une technologie standard pour l'étude de l'ADNcir dans l'optique de définir son rôle dans la prise en charge des patients dans la pratique clinique. Un autre défi est de comparer les différentes technologies existantes et à venir pour définir pour chacune d'elles un rôle particulier en fonction des avantages et des limites inhérentes à chaque technique. Dans notre étude, nous avons utilisé Sequenom®, un spectromètre de masse permettant une analyse en multiplex, afin d'épargner le matériel génétique pour l'analyse de plusieurs mutations. Les résultats de notre étude en terme de détection de mutations seront détaillés plus loin.

La première étape de l'étude de l'ADNcir consiste à pouvoir quantifier l'ADNcir extrait à partir d'un volume de plasma ou de sérum, qui peut varier en fonction des études, afin de pouvoir les comparer. Dans ce but, les résultats sont exprimés en nanogrammes d'ADNcir issu d'un millilitre de plasma. La concentration d'ADNcir est de l'ordre des dizaines de nanogrammes par ml de plasma, beaucoup plus faible que la concentration d'ADN extrait de tissu tumoral, qui est en général entre 50 et 150ng/ul. La quantification de telles concentrations nécessite donc des techniques plus sensibles que le spectrophotomètre utilisé en pratique courante. La majorité des

études utilisent des techniques fluorométriques de différentes sortes comme le PicoGreen et de SYBRgreen, permettant de détecter des faibles concentrations jusqu'à un ng/ml (Vitzthum et al., 1999 ; Szpechcinski et al., 2008). Pour notre travail, nous avons choisi d'utiliser le Picogreen pour sa facilité d'utilisation, sa faible consommation d'ADN et sa reproductibilité. Il est à noter qu'aucune technique standard n'est actuellement recommandée par manque d'études comparatives.

La deuxième étape qui consiste à rechercher des mutations dans l'ADNcir a déjà fait l'objet de nombreuses publications, et est clairement la partie la plus critique.

Les plateformes de séquençage à haut débit sont de plus en plus utilisées pour l'analyse de l'exome à partir du tissu tumoral. L'utilisation de ces techniques a été réalisée à partir de l'ADNcir, que ce soit pour la recherche d'un réarrangement génétique ou la caractérisation de l'ADNcir (Leary et al., 2010 ; Van der Vaart et al., 2009). Ces techniques nécessitent un ADN non dégradé et en grande quantité, à l'opposé des caractéristiques de l'ADNcir, limitant leur utilisation dans cette situation. Néanmoins, le développement de plateformes de haut débit et la sensibilité de plus en plus performante des techniques utilisées, ont permis l'obtention de résultats de plus en plus précis concernant la détection de mutations dans l'ADNcir. L'étude de l'ADNcir impose l'utilisation de techniques sensibles du fait de la très faible concentration de l'ADNcir dans le plasma, et de la proportion importante d'ADNcir issu des cellules normales de l'organisme, engendrant un bruit de fond important.

Une des techniques pour limiter ce bruit de fond est l'utilisation de PNA (peptid nucleic acid), séquence spécifique de l'allèle sauvage étudié, qui inhibe la réaction d'amplification, et donc permet d'amplifier en priorité les séquences mutées de

l'allèle étudié. Ainsi, dans une étude portant sur 12 patients atteints d'un CCR métastatique, avec mutation *KRAS*, 7 (58%) présentaient la même mutation dans le sérum (Lefebure et al., 2010). Une autre approche consiste en l'utilisation des modifications génétiques identifiées dans le tissu tumoral telles que des translocations, pour le développement de sondes spécifiques de ces translocations afin de les détecter dans l'ADNcir, à des fins de surveillance de récurrence de la maladie. Cette approche a une principale contrainte qui est l'étape d'analyse de la tumeur pour le développement des sondes spécifiques (Leary et al., 2010 ; McBride et al., 2010).

Une technologie semble particulièrement adaptée à l'étude de l'ADNcir, la PCR digitale. Elle consiste en l'amplification d'une seule cible moléculaire. Ainsi, le résultat de l'analyse sera binaire, répondant par la présence ou non de l'anomalie moléculaire recherchée. Un des moyens de compartimenter les réactions de PCR pour aboutir à cette analyse consiste à isoler une molécule d'ADN au sein de gouttes d'eau dans l'huile (Taly et al., 2012). Ainsi, existe le BEAMing (Beads, Emulsions, amplifications and Magnetics). Au sein d'une gouttelette, une bille est liée à des amorces spécifiques, permettant une amplification à grande échelle. Chaque bille est liée à des milliers de molécules avec la même séquence, diminuant de façon drastique le bruit de fond. Les billes subissent ensuite une hybridation avec des sondes fluorescentes spécifiques des séquences mutées et non mutées, séparées par la cytométrie de flux (Diehl et al., 2006). Cette méthode est capable de détecter une séquence mutée au sein de 10000 séquences sauvages (Li et al., 2006). Ainsi, la technique du BEAMing a été utilisée avec succès pour la détection de mutations de *KRAS*, *APC*, *p53* et *PIK3CA* dans le ADNcir de 16 patients atteints d'un CCR. La sensibilité de la technique était de 50% en préopératoire (Diehl et al., 2008b). Un cas

rapporté a montré l'intérêt de cette technique pour distinguer 2 résultats discordants du statut mutationnel d'un tissu tumoral de CCR, reflétant l'hétérogénéité tumorale, par la détection de la mutation dans le plasma d'un patient (Holdhoff JNCI 2009). Une étude plus ancienne s'était intéressée à la capacité de détection de mutation du gène *APC* dans le plasma en fonction du stade du CCR. Ainsi, une mutation du gène *APC* était détectable dans le plasma chez l'ensemble des 6 patients ayant un CCR avancé, chez plus de 60% des patients avec un stade plus précoce, et même chez un patient ne présentant qu'un adénome (Diehl et al., 2005). Cette technique a été étudiée dans d'autres localisations tumorales. Dans une étude comprenant 44 patients porteurs d'un CBNPC dont la tumeur présentait une mutation activatrice du gène de l'EGFR, 32 (72,7%) avaient une mutation détectable dans le plasma. Dans le sous groupe des 23 patients présentant une progression sous TKI, 10 (43,5%) avaient la mutation T790M détectable dans le plasma (Taniguchi et al., 2011). Dans un étude portant sur 34 patientes atteintes d'un cancer du sein, le taux de concordance du statut mutationnel du gène *PIK3CA* entre le tissu d'archive et le ADNcir était de 100% (Higgins et al., 2012). Une autre technique de PCR digitale a lieu dans des gouttelettes générées par la technique de microfluidique. Ce système permet de compartimenter l'équivalent d'une molécule d'ADN au sein d'une gouttelette. Une réaction de PCR est réalisée en présence de 2 sondes Taqman®, une spécifique de l'allèle mutant et l'autre spécifique de l'allèle sauvage, générant une fluorescence différente. Un ratio mutant/sauvage peut donc être quantifié à partir des 2 fluorescences. Cette méthode permet la détection d'une séquence mutée *KRAS* au sein de 200000 séquences sauvages, et pourrait être utilisée dans le cadre de l'ADNcir (Pekin et al., 2011).

Une autre technique semble adaptée à la détection de mutation dans l'ADNcir. Il s'agit de l'association d'une PCR appelée ARMS (Amplification Refractory Mutation System) et de sondes spécifiques Scorpions. La technique de PCR-ARMS est basée sur le principe qu'une amplification ne peut avoir lieu que si l'extrémité 3' de l'amorce s'hybride avec la séquence d'ADN complémentaire. Ainsi, seules les séquences mutées sont amplifiées. Les sondes Scorpions sont quant à elles des molécules bifonctionnelles qui contiennent une amorce d'amplification de PCR et une sonde fluorescente. Lors de la réaction de PCR, un amplicon est formé, et la sonde s'hybride à cet amplicon car les séquences sont complémentaires, pour libérer un signal fluorescent. La quantité de fluorescence est donc proportionnelle à la quantité de séquences mutantes amplifiées (Board et al., 2008a). Cette technique a montré des résultats performants pour la détection de mutations dans l'ADNcir dans différentes localisations tumorales telles que le sein, le mélanome et de CBNPC (Kuang et al., 2009). Dans une étude prospective sur 126 patients atteints de mélanome avancé, un taux de concordance du statut mutationnel *BRAF* montait à 75%, mais un tiers des échantillons tumoraux n'étaient pas disponibles (Board et al., 2009). Dans une autre étude portant sur 41 patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique, le statut mutationnel de *PIK3CA* était concordant entre le tissu tumoral et le ADNcir dans 95% des cas (Board et al., 2010). Une association de cette méthode et des PNA a été testée dans une étude portant sur des patients atteints d'un CCR métastatique. Parmi les 95 patients, une majorité des mutations de *KRAS* détectées dans les tumeurs l'étaient aussi dans le ADNcir, soit 32 sur 41 (78%) (Spindler et al., 2012).

La PCR avec introduction de sites de restriction (RFLP) permet un enrichissement en séquences d'ADN muté. Le principe repose sur l'utilisation

d'amorces contenant une séquence créant un site de restriction lors de l'amplification de l'allèle sauvage et non de l'allèle muté. Ainsi, la digestion par l'enzyme de restriction permet l'élimination des séquences sauvages et enrichit le produit de PCR en séquences mutées. Cette technique a montré de bons résultats pour le suivi de patients opérés d'un CCR. Ainsi, un groupe de 78 patients a eu un prélèvement de sérum en pré opératoire, dont 41 présentaient une mutation *KRAS*. Parmi ces patients, une mutation identique a été identifiée chez 31 (76%) patients. Une deuxième cohorte de suivi postopératoire comprenant 94 patients dont 60 présentaient une mutation *KRAS* au niveau de la tumeur, a montré la persistance d'une mutation *KRAS* dans le sérum chez 16 d'entre eux. Parmi ces patients, 10 (63%) ont récidivé contre 1 patient dans le groupe sans détection de mutation dans le sérum (Ryan et al., 2003). Une autre étude dans le CBNPC montre un taux de corrélation de 76,7% pour la détection de mutation *KRAS* (23/30 mutations) parmi une cohorte de 273 patients (Wang et al., 2010).

Une autre méthode qui peut être employée pour la détection de mutations dans l'ADNcir est la chromatographie liquide de dénaturation de haute résolution (dHPLC) et une variante récente l'électrophorèse capillaire de dénaturation (DCE). Le principe de ces techniques repose sur la séparation de fragments de PCR double-brins partiellement dénaturés. Les homoduplexes sont des fragments dont la complémentarité de séquence est parfaite alors que les hétéroduplexes présentent des séquences complémentaires sauf au niveau de la mutation. La formation de ces homo et hétérodimères a lieu lors d'une phase de dénaturation suivie d'un réappariement lent en fin de réaction de PCR. Lors d'une électrophorèse à température optimale, les homodimères, dont la température de fusion est plus élevée, vont rester à un état non dénaturé et migrer plus rapidement que les

hétérodimères qui vont migrer plus lentement du fait d'une structure dénaturée. Ainsi, chez 230 patients présentant un CBNPC de stade avancé, une mutation de l'*EGFR* a été trouvée par cette technique chez 79 (34,3%) patients, et dans 63 (79,9%) des tissus tumoraux correspondants (Bai et al., 2009).

Les résultats de notre étude sont donc comparables aux autres études, en terme de concordance de détection de mutation entre le tissu tumoral d'archive et l'ADNcir. Ainsi, un taux de concordance de 70% pour le gène *KRAS* et de 100% pour le gène *BRAF* dans le CCR, de 75% pour le gène *PIK3CA* dans le cancer du sein et de 50% pour le gène *BRAF* dans le mélanome. Notre travail a de particulier qu'il est le premier à avoir testé la plateforme du Sequenom® avec le panel Oncocarta pour la recherche de mutations dans l'ADNcir.



### IV.3 Perspectives de l'utilisation de l'ADN circulant

L'ADNcir est détectable à différents stades de la maladie cancéreuse, avec un taux plus important en cas de stade plus avancé de la maladie. Cette « biopsie liquide » pourrait donc être utilisée comme outil diagnostique, pronostique ou prédictif de réponse à des thérapies anticancéreuses. Comme nous l'avons mentionné plus haut, il sera indispensable de faire un choix stratégique concernant le type de technologie utilisée et de démontrer que l'ADNcir a un rôle dans la prise en charge des patients dans des études cliniques prospectives.

On pourrait envisager d'utiliser l'ADNcir comme outil diagnostique. Dans notre étude, nous avons montré que le taux d'ADNcir était plus élevé chez les patients que chez les volontaires sains, dans plusieurs types tumoraux et notamment dans les CCR. Une étude anglaise montre des résultats intéressants en utilisant le taux d'ADNcir détecté pour distinguer des patients atteints d'un CCR ou de polypes coliques, par rapport à des sujets sains, suggérant l'utilisation de l'ADNcir dans la stratégie de dépistage de CCR dans la population asymptomatique (Mead et al., 2011). Une autre étude a montré des résultats intéressants de l'utilisation du taux d'ADNcir associé au taux d'ACE pour le diagnostic des stades précoces de CCR. Ainsi, l'association des taux d'ACE et d'ADNcir avait une sensibilité de 84% et une spécificité de 88% (Flamini et al., 2006). Malgré tout, des réserves sont à émettre quant à l'utilisation de l'ADNcir comme test de dépistage et/ou diagnostique. En effet, comme décrit précédemment, il existe des situations physiologiques au cours desquelles un taux élevé d'ADNcir a été rapporté. D'autre part, seule une partie des tumeurs présente des altérations génétiques telles que les mutations, ne permettant pas d'utiliser ce paramètre comme critère diagnostique. La question de l'intérêt diagnostique de l'ADNcir se pose de façon pertinente dans les tumeurs pour

lesquelles la procédure biopsique diagnostique est dangereuse et/ou de faible rendement. Par exemple, la réalisation d'une biopsie de tumeur cérébrale est parfois critique du fait de la difficile accessibilité de la tumeur sans risquer d'endommager des tissus sains présentant une fonction importante. Ainsi, une étude récente a montré que l'ADNcir était détectable pour des tumeurs cérébrales de faible malignité, et que des altérations génétiques y étaient identifiables, que ce soient des pertes d'hétérozygotie ou des modifications épigénétiques, avec une forte spécificité (Lavon et al., 2010). D'autre part, la demande de caractérisation moléculaire des CBNPC est de plus en plus importante, alors que la quantité de tissu tumoral est souvent restreint, pouvant se résumer à des biopsies bronchiques de petite taille. La recherche de mutations *KRAS* pourrait alors être réalisée à partir de l'ADNcir, lorsque le tissu tumoral ne peut pas être utilisé, comme le montrait un travail utilisant la technique de PCR-RFLP (Wang et al., 2010). Dans de telles situations, l'ADNcir pourrait trouver une place diagnostique, en démontrant la présence d'une mutation spécifique du cancer suspecté, et en l'intégrant à un faisceau d'arguments diagnostique (clinique, biologique, radiologique).

Nous avons aussi montré dans notre étude que la quantité d'ADNcir pouvait être corrélée à la survie des patients. L'ADNcir pourrait donc être utilisé comme facteur pronostique, comme le suggèrent plusieurs études, notamment dans le CCR. Ainsi, la présence d'ADNcir en pré-opératoire est corrélée à une diminution de la survie sans récurrence (Lecomte et al., 2002). Un taux élevé d'ADNcir est corrélé à une diminution de la survie sans récurrence (Schwarzenbach et al., 2008). La diminution de la survie est aussi corrélée à un taux élevé d'ADNcir dans le CBNPC (Van der Drift et al., 2009). Dans notre travail, nous avons montré qu'un taux élevé d'ADNcir, supérieur au taux d'ADNcir le plus élevé dans le groupe des volontaires sains, était

corrélé à une diminution de la SG en analyse multivariée ( $p=0,045$ ). De plus, nous avons trouvé une corrélation entre le taux d'ADNcir et le score pronostique utilisé pour prédire l'évolution des patients inclus dans un essai thérapeutique précoce, le RMH (Royal Marsden Hospital) score. Ainsi, la concentration d'ADNcir, le taux d'albumine inférieur à 35g/L et le stade OMS étaient des facteurs indépendants de mauvais pronostic.

Une des applications les plus intéressantes pourrait être d'utiliser l'ADNcir comme un outil pour monitorer les traitements, en particulier les thérapies ciblées. Il est probable que l'ADNcir ne remplacera pas l'analyse de la biopsie tumorale ou de la métastase en début de traitement. Un nombre croissant d'études montre l'intérêt des biopsies tumorales pour établir des « portraits moléculaires » qui pourraient permettre d'adapter les thérapies ciblées. Plusieurs essais sont en cours en France comme les essais SAPHIR (dans le cancer du sein), MOSCATO et SHIVA (en phase I). Par contre, il semble difficile d'imaginer qu'il soit possible de faire subir à nos patients des biopsies séquentielles répétées jusqu'à 5 ou 6 fois en cours de traitement ou au moment de la progression. Comme décrit précédemment, le taux d'ADNcir est corrélé à la masse tumorale, au risque de récurrence et à la survie des patients. Le suivi du taux d'ADNcir pourrait être un outil pour le diagnostic précoce de réponse au traitement ou de progression, comme suggéré par une étude portant sur 14 patients atteints d'un CCR et dont le taux d'ADNcir variait au cours du traitement par chimiothérapie, avec une nette majorité de diminution du taux en début de traitement (Schwarzenbach et al., 2008). Ceci a aussi été montré dans d'autres types tumoraux, tels que le CBNPC, pour lequel le taux d'ADNcir lors du suivi s'élevait lorsqu'une récurrence était diagnostiquée, alors qu'il diminuait lors d'absence de récurrence (Sozzi et al., 2001). Toujours dans le CBNPC, dans une autre étude portant

sur des patients traités par chimiothérapie et tirapazamine, 12 patients présentaient des analyses de recherche de mutation *KRAS* en pré et post traitement : les 3 patients non progressifs montraient une disparition de mutation *KRAS* initialement détectable dans l'ADNcir, alors qu'elle était toujours détectable chez un patient en progression clinique (Kimura et al., 2004). Dans le cancer du sein, une étude a été présentée au congrès de l'ESMO 2012 (société européenne d'oncologie médicale). Sur une population de 16 patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique, l'ADNcir apparaissait comme un meilleur marqueur pronostique que les cellules tumorales circulantes (CTCs). Par ailleurs, l'élévation du taux d'ADNcir précédait de 5 mois en moyenne l'imagerie pour diagnostiquer la progression de la maladie (Dawson et al., 2012). La détection de mutations spécifiques peut aussi être utilisée pour la surveillance des patients sous traitement antitumoral, notamment les TMC. Dans le CCR, deux études ont montré l'intérêt d'une telle démarche. Ainsi, par la technique du BEAMing, l'apparition d'une mutation *KRAS* détectée dans l'ADNcir chez un patient traité par cetuximab peut précéder de 10 mois la progression radiologique, représentant un gain significatif de temps pour le diagnostic de résistance au traitement (Misale et al., 2012). Un autre travail montre des résultats similaires chez des patients traités par panitumumab. Sur 24 patients, 9 (38%) présentaient une mutation *KRAS* dans l'ADNcir, alors que la tumeur avait été testée comme étant sauvage, précédant de 5 mois la progression radiologique (Diaz et al., 2012). Une des hypothèses est que la mutation *KRAS* préexistait dans la tumeur mais était initialement non détectable, et que le traitement par anti-EGFR crée une pression sélectionnant ce clone, et entraînant la résistance au traitement. L'autre hypothèse est une forme de mécanisme de résistance de la tumeur aux traitements anti-EGFR par l'acquisition de nouvelle mutation (Vilar et al., 2012). Une étude chez

des patients atteints d'un mélanome métastatique sous traitement, a étudié la cinétique de détection de la mutation *BRAF* V600E dans le sérum. Ainsi, parmi les patients avec une mutation détectable dans le sérum avant traitement, dans le groupe des répondeurs, la mutation n'était plus détectable que chez 10% des patients, alors qu'elle était toujours retrouvée chez 70% des non répondeurs (Shinozaki et al., 2007).

Enfin, l'étude de l'ADNcir pourrait permettre de mieux comprendre le processus métastatique. Actuellement, se pose la question de l'hétérogénéité tumorale, et de la représentativité d'une biopsie en terme d'analyse génétique de la tumeur. En effet, un travail récent réalisé sur le cancer du rein montre une hétérogénéité intra tumorale sur des mutations importantes telles que les gènes *mTOR* et *PTEN* (Gerlinger et al., 2012). Paradoxalement, dans notre étude, nous avons montré qu'il existait globalement un bon taux de concordance entre le tissu tumoral primitif et l'ADNcir pour la détection des mutations d'oncogènes. Dans le CCR, une étude portant sur 69 tumeurs primitives a analysé les mutations des codons 12 et 13 du gène *KRAS* et du codon 600 du gène *BRAF*, à partir d'au moins 2 échantillons de la tumeur. Une hétérogénéité intra-tumorale était établie dans 10,1% des cas, soit 7,2% pour *KRAS* et 2,9% pour *BRAF*. La détection des mutations était rattrapée par la réalisation de l'analyse à partir d'un «cocktail» d'ADN, issu d'au moins 2 échantillons de la tumeur (Richman et al., 2011). Même si cette hétérogénéité est peu fréquente, elle est à prendre en considération. La même question se pose concernant la représentativité de l'analyse génétique des tumeurs primitives vis à vis des métastases. Plusieurs études ont montré une hétérogénéité entre la tumeur primitive et les métastases, avec une concordance de 93% en moyenne concernant le statut mutationnel de *KRAS* (Baas et al., 2011 ; Otsuka et

al., 2012 ; Cejas et al., 2009 ; Bouchahda et al., 2010 ; Baldus et al., 2010 ; Albanese et al., 2004 ; Santini et al., 2008 ; Artale et al., 2008 ; Molinari et al., 2009). L'étude de Baldus et al. porte sur 100 tumeurs de CCR, et sur 55 ganglions et 20 métastases correspondants. Les statuts mutationnels du gène *KRAS*, mais aussi des gènes *BRAF* et *PIK3CA* ont été analysés. Ainsi, une hétérogénéité intratumorale a été trouvée dans 8% des cas pour le gène *KRAS*, 1% des cas pour le gène *BRAF* et 5% des cas pour le gène *PIK3CA*. Une hétérogénéité entre la tumeur primitive et la métastase correspondante est rapportée dans 10% des cas pour le gène *KRAS* et 5% des cas pour le gène *PIK3CA*, mais pas pour le gène *BRAF*. Point intéressant, dans plus de la moitié des cas discordants, l'analyse d'échantillons supplémentaires permettait de déterminer un statut mutationnel concordant entre la tumeur primitive et la métastase, renforçant le concept d'hétérogénéité intra-tumorale et mais aussi au sein des métastases (Baldus et al., 2010). L'ADNcir permettrait de pallier à ce problème d'hétérogénéité. Toujours dans le CCR, une étude plus récente a porté sur la concordance du statut mutationnel *KRAS* entre la tumeur primitive et les métastases hépatiques correspondantes. Elle a comparé 305 patients, et le taux de concordance était élevé à 96,4% (Knijn et al., 2011). Il est intéressant de noter que ce travail plus puissant que les précédents ne s'intéresse qu'aux métastases hépatiques qui sont le premier type de métastase dans le CCR, alors que les autres études peuvent porter sur d'autres sites métastatiques. Ainsi, une étude coréenne portant sur 143 patients montrait un taux de concordance élevé entre la tumeur primitive et le site métastatique, de 87,7%, excepté pour le site pulmonaire où le taux de concordance tombait à 32,4% (Kim et al., 2012a).

# Conclusion

La prise en charge des patients atteints d'un cancer a été radicalement modifiée par l'avènement de l'ère des thérapies moléculaires ciblées au début du XXIème siècle. Ces nouvelles stratégies thérapeutiques ont non seulement permis d'augmenter la survie des patients atteints de cancer métastatique dans différents types tumoraux, en particulier les plus fréquents comme le cancer du sein, du poumon, de la prostate et du colon, mais elles ont aussi permis d'intégrer les données acquises sur la biologie du cancer dans la pratique clinique, que ce soit au cours de protocoles de recherche ou dans les soins aux patients. Ainsi, la prise en charge des cancers du colon en 2012 illustre bien les changements majeurs qui ont été effectués durant ces dix dernières années : démonstration de l'efficacité de thérapies ciblées associées ou non à la chimiothérapie (cetuximab, panitumumab, bevacizumab, regorafenib) ; identification des premiers biomarqueurs moléculaires permettant de sélectionner les patients qui répondront le mieux aux traitements ciblés (mutation *KRAS*, *BRAF*) ; intégration de ces nouvelles stratégies dans la prise en charge globale des patients du stade métastatique aux stades plus précoces. La compréhension des mécanismes de résistance primaire et secondaire aux thérapies ciblées est donc un enjeu majeur des 10 prochaines années, pour permettre d'affiner nos critères de sélection, mais aussi pour développer des stratégies thérapeutiques plus efficaces. De plus, il est indispensable de développer des outils en pratique clinique qui permettront de suivre les modifications moléculaires de la maladie cancéreuse chez chaque patient.

Dans la première partie de notre travail, nous avons étudié le niveau d'activation des deux voies de signalisation principales en aval de la protéine *KRAS*



(MAPK et PI3K) qui permettraient de comprendre les mécanismes de résistance primaire aux anticorps anti-EGFR (comme le cetuximab), au delà des mutations *KRAS*. Notre travail a ainsi montré que le niveau d'expression de p70S6K et de MEK étaient associés à la survie des patients traités par cetuximab indépendamment du statut mutationnel de *KRAS*. Ainsi, notre travail suggère que l'activation des voies de signalisation MAPK et PI3K, indépendamment d'une mutation *KRAS* semble pronostique de résistance au traitement par cetuximab et de la survie globale. Les résultats de ce travail doivent être confirmés, et intégrés avec l'ensemble des données concernant les autres mécanismes de résistance au cetuximab. Il est possible d'imaginer que dans un futur proche, chaque patient puisse avoir une « carte d'identité de sa tumeur », qui intégrerait le statut des principales altérations moléculaires d'intérêt (comme les gènes *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*), mais aussi les niveaux d'activation des voies de signalisation. Cette approche serait particulièrement pertinente chez les patients ayant un cancer du colon métastatique.

Dans une seconde étape, nous avons travaillé sur la mise au point d'une technologie qui permettrait de suivre les altérations moléculaires tumorales dans le sang des patients atteints de cancer avancé. Cette démarche a pris le parti de s'intéresser à l'ADN circulant, et d'utiliser une technique de spectrométrie de masse : le SEQUENOM. Notre étude a montré que cette technique est très sensible puisqu'elle permet de détecter des mutations à une concentration de 40ng/ml (test sur HCT116, mutation *KRAS* G13D). De plus, la concentration d'ADN circulant est corrélée à la survie globale des patients. Enfin, le taux de concordance de détection de mutation entre le tissu tumoral d'archive et le cADN était très élevé, de l'ordre de 70-100% en fonction du type de tumeur et de mutation. La détection des altérations

moléculaires (mutations, délétions, amplifications) au sein de la tumeur sera probablement indispensable pour mieux comprendre l'évolution des tumeurs, mais aussi pour adapter les thérapeutiques, en particulier les thérapies ciblées. A ce jour, le tissu tumoral d'archive ou les biopsies des sites métastatiques sont nécessaires pour avoir accès à du matériel tumoral de qualité. Cependant, il sera difficile de proposer de réaliser plusieurs biopsies à des patients, et dans certains cas, ces biopsies ne sont pas réalisables. Ainsi, un des défis majeurs des prochaines années sera de mettre au point des technologies performantes qui permettront une analyse du matériel tumoral de façon moins invasive, en utilisant le sang des patients. Il est probable qu'une simple prise de sang puisse remplacer une biopsie tumorale, que le matériel génétique extrait de ce prélèvement puisse servir à la détection de mutations ou au suivi d'un profil moléculaire donné. Les applications sont nombreuses, de la détection d'une mutation pour un traitement, du suivi d'un nouveau traitement, au diagnostic de rechute.

Nos travaux illustrent l'intérêt majeur de l'interaction entre le monde de la biologie fondamentale de la cellule ou de la biologie moléculaire et celui de la clinique. Les connaissances de la biologie ont permis d'identifier les altérations moléculaires principales de la plupart des cancers, et ont ainsi permis le développement des premières générations de thérapies moléculaires ciblées (cetuximab, trastuzumab, erlotinib...) dans différents cancers. La compréhension des mécanismes moléculaires de résistances primaire ou secondaire ont permis d'identifier les patients qui étaient le plus à même de répondre ou non à ces traitements. L'identification de nouveaux mécanismes de résistance permettra de mieux sélectionner les patients pour chaque thérapeutique mais aussi d'imaginer de

nouvelles stratégies thérapeutiques. De plus, l'étude de ces anomalies à partir de prélèvements peu invasifs comme le sang (ADN circulant) pourrait permettre de proposer un suivi de ces altérations de façon simple et répétée.

# Références

Ahnen, D. J., P. Feigl, et al. (1998). "Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study." Cancer Res **58**(6): 1149-58.

Ahrendt, S. A., P. A. Decker, et al. (2001). "Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung." Cancer **92**(6): 1525-30.

Albanese, I., A. G. Scibetta, et al. (2004). "Heterogeneity within and between primary colorectal carcinomas and matched metastases as revealed by analysis of Ki-ras and p53 mutations." Biochem Biophys Res Commun **325**(3): 784-91.

Alberts, S. R., D. J. Sargent, et al. (2012). "Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial." JAMA **307**(13): 1383-93.

Alix-Panabieres, C., H. Schwarzenbach, et al. (2012). "Circulating tumor cells and circulating tumor DNA." Annu Rev Med **63**: 199-215.

Amado, R. G., M. Wolf, et al. (2008). "Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer." J Clin Oncol **26**(10): 1626-34.

Andreyev, H. J., A. R. Norman, et al. (2001). "Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study." Br J Cancer **85**(5): 692-6.

Andreyev, H. J., A. R. Norman, et al. (1998). "Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study." J Natl Cancer Inst **90**(9): 675-84.

Anker, P., F. Lefort, et al. (1997). "K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer." Gastroenterology **112**(4): 1114-20.

Anker, P., M. Stroun, et al. (1975). "Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system." Cancer Res **35**(9): 2375-82.

Artale, S., A. Sartore-Bianchi, et al. (2008). "Mutations of KRAS and BRAF in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer." J Clin Oncol **26**(25): 4217-9.

Arteaga, C. L. and J. Baselga (2003). "Clinical trial design and end points for epidermal growth factor receptor-targeted therapies: implications for drug development and practice." Clin Cancer Res **9**(5): 1579-89.

Baas, J. M., L. L. Krens, et al. (2011). "Concordance of predictive markers for EGFR inhibitors in primary tumors and metastases in colorectal cancer: a review." Oncologist **16**(9): 1239-49.

Bai, H., L. Mao, et al. (2009). "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 **27**(16): 2653-9.

Baldus, S. E., K. L. Schaefer, et al. (2010). "Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases." Clin Cancer Res **16**(3): 790-9.

Balmanno, K., S. D. Chell, et al. (2009). "Intrinsic resistance to the MEK1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) is associated with weak ERK1/2 signalling and/or strong PI3K signalling in colorectal cancer cell lines." Int J Cancer **125**(10): 2332-41.

Barault, L., C. Charon-Barra, et al. (2008). "Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: study on a population-based series of 582 cases." Cancer Res **68**(20): 8541-6.

Barber, T. D., B. Vogelstein, et al. (2004). "Somatic mutations of EGFR in colorectal cancers and glioblastomas." N Engl J Med **351**(27): 2883.

Bennouna, J., I. Lang, et al. (2011). "A Phase II, open-label, randomised study to assess the efficacy and safety of the MEK1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) versus capecitabine monotherapy in patients with colorectal cancer who have failed one or two prior chemotherapeutic regimens." Invest New Drugs **29**(5): 1021-8.

Benvenuti, S., A. Sartore-Bianchi, et al. (2007). "Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies." Cancer Res **67**(6): 2643-8.

Bhaskar, P. T. and N. Hay (2007). "The two TORCs and Akt." Dev Cell **12**(4): 487-502.

Bibeau, F., E. Lopez-Crapez, et al. (2009). "Impact of Fc{gamma}RIIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan." J Clin Oncol **27**(7): 1122-9.

Board, R. E., A. M. Wardley, et al. (2010). "Detection of PIK3CA mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer." Breast Cancer Res Treat **120**(2): 461-7.

Board, R. E., G. Ellison, et al. (2009). "Detection of BRAF mutations in the tumour and serum of patients enrolled in the AZD6244 (ARRY-142886) advanced melanoma phase II study." Br J Cancer **101**(10): 1724-30.

Board, R. E., N. J. Thelwell, et al. (2008). "Multiplexed assays for detection of mutations in PIK3CA." Clin Chem **54**(4): 757-60.

Board, R. E., V. S. Williams, et al. (2008). "Isolation and extraction of circulating tumor DNA from patients with small cell lung cancer." Ann N Y Acad Sci **1137**: 98-107.

Bokemeyer, C., I. Bondarenko, et al. (2011). "Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study." Ann Oncol **22**(7): 1535-46.

Bokemeyer, C., I. Bondarenko, et al. (2009). "Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer." J Clin Oncol **27**(5): 663-71.

Bouali, S., A. S. Chretien, et al. (2009). "PTEN expression controls cellular response to cetuximab by mediating PI3K/AKT and RAS/RAF/MAPK downstream signaling in KRAS wild-type, hormone refractory prostate cancer cells." Oncol Rep **21**(3): 731-5.

Bouchahda, M., A. Karaboue, et al. (2010). "Acquired KRAS mutations during progression of colorectal cancer metastases: possible implications for therapy and prognosis." Cancer Chemother Pharmacol **66**(3): 605-9.

Bralet, M. P., B. Paule, et al. (2007). "Immunohistochemical variability of epidermal growth factor receptor (EGFR) in liver metastases from colonic carcinomas." Histopathology **50**(2): 210-6.

- C -

Camp, E. R., J. Summy, et al. (2005). "Molecular mechanisms of resistance to therapies targeting the epidermal growth factor receptor." Clin Cancer Res **11**(1): 397-405.

Cappuzzo, F., G. Finocchiaro, et al. (2008). "EGFR FISH assay predicts for response to cetuximab in chemotherapy refractory colorectal cancer patients." Ann Oncol **19**(4): 717-23.

Cappuzzo, F., M. Varella-Garcia, et al. (2008). "Primary resistance to cetuximab therapy in EGFR FISH-positive colorectal cancer patients." Br J Cancer **99**(1): 83-9.

Cappuzzo, F., E. Magrini, et al. (2004). "Akt phosphorylation and gefitinib efficacy in patients with advanced non-small-cell lung cancer." J Natl Cancer Inst **96**(15): 1133-41.

Cejas, P., M. Lopez-Gomez, et al. (2009). "KRAS mutations in primary colorectal cancer tumors and related metastases: a potential role in prediction of lung metastasis." PLoS One **4**(12): e8199.

Chang, C. P., R. H. Chia, et al. (2003). "Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction." Clin Chim Acta **327**(1-2): 95-101.

Chen, H., H. Tu, et al. (2010). "K-ras mutational status predicts poor prognosis in unresectable pancreatic cancer." Eur J Surg Oncol **36**(7): 657-62.

Chergui, F., A. S. Chretien, et al. (2009). "Validation of a phosphoprotein array assay for characterization of human tyrosine kinase receptor downstream signaling in breast cancer." Clin Chem **55**(7): 1327-36.

Chu, C., M. S. Noel-Hudson, et al. (2012). "Therapeutic efficiency of everolimus and

lapatinib in xenograft model of human colorectal carcinoma with KRAS mutation." Fundam Clin Pharmacol.

Chung, K. Y., J. Shia, et al. (2005). "Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry." J Clin Oncol **23**(9): 1803-10.

Cortese, R., A. Kwan, et al. (2012). "Epigenetic markers of prostate cancer in plasma circulating DNA." Hum Mol Genet **21**(16): 3619-31.

Cully, M., H. You, et al. (2006). "Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis." Nat Rev Cancer **6**(3): 184-92.

Cunningham, D., Y. Humblet, et al. (2004). "Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer." N Engl J Med **351**(4): 337-45.

- D -

Dawson, S., D. Tsui, et al. "Monitoring of metastatic breast cancer using circulating tumour DNA: a comparison with circulating tumour cells." ESMO congress 2012, Abstract 1710. Ann Oncol 23 (Supplement 9): ix73-ix94.

De Mattos-Arruda, L., D. Olmos, et al. (2011). "Prognostic and predictive roles for circulating biomarkers in gastrointestinal cancer." Future Oncol **7**(12): 1385-97.

De Roock, W., D. J. Jonker, et al. (2012). "Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab." JAMA **304**(16): 1812-20.

De Roock, W., B. Claes, et al. (2010). "Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis." Lancet Oncol **11**(8): 753-62.

De Roock, W., H. Piessevaux, et al. (2008). "KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab." Ann Oncol **19**(3): 508-15.

Deng, G., I. Bell, et al. (2004). "BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer." Clin Cancer Res **10**(1 Pt 1): 191-5.

Dewdney, A., D. Cunningham, et al. (2012). "Multicenter randomized phase II clinical trial comparing neoadjuvant oxaliplatin, capecitabine, and preoperative radiotherapy with or without cetuximab followed by total mesorectal excision in patients with high-risk rectal cancer (EXPERT-C)." J Clin Oncol **30**(14): 1620-7.



Di Fiore, F., F. Blanchard, et al. (2007). "Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy." Br J Cancer **96**(8): 1166-9.

Diaz, L. A., Jr., R. T. Williams, et al. (2012). "The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers." Nature **486**(7404): 537-40.

Diehl, F., M. Li, et al. (2005). "Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(45): 16368-73.

Diehl, F., M. Li, et al. (2006). "BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions." Nat Methods **3**(7): 551-9.

Diehl, F., K. Schmidt, et al. (2008). "Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics." Nat Med **14**(9): 985-90.

Diehl, F., K. Schmidt, et al. (2008). "Analysis of mutations in DNA isolated from plasma and stool of colorectal cancer patients." Gastroenterology **135**(2): 489-98.

Douillard, J. Y., S. Siena, et al. (2010). "Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study." J Clin Oncol **28**(31): 4697-705.

Duval, A., J. Gayet, et al. (1999). "Frequent frameshift mutations of the TCF-4 gene in colorectal cancers with microsatellite instability." Cancer Res **59**(17): 4213-5.

Duval, A. and R. Hamelin (2002). "Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability." Cancer Res **62**(9): 2447-54.

- E -

Eberhard, D. A., B. E. Johnson, et al. (2005). "Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib." J Clin Oncol **23**(25): 5900-9.

Edwards, J. R., H. Ruparel, et al. (2005). "Mass-spectrometry DNA sequencing." Mutat Res **573**(1-2): 3-12.

el-Deiry, W. S., B. D. Nelkin, et al. (1991). "High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(8): 3470-4.

- F -

Fan, Z., H. Masui, et al. (1993). "Blockade of epidermal growth factor receptor function by bivalent and monovalent fragments of 225 anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies." Cancer Res **53**(18): 4322-8.

Fearon, E. R. (2011). "Molecular genetics of colorectal cancer." Annu Rev Pathol **6**: 479-507.

Flamini, E., L. Mercatali, et al. (2006). "Free DNA and carcinoembryonic antigen serum levels: an important combination for diagnosis of colorectal cancer." Clin Cancer Res **12**(23): 6985-8.

Fodde, R., J. Kuipers, et al. (2001). "Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability." Nat Cell Biol **3**(4): 433-8.

Francoual, M., M. C. Etienne-Grimaldi, et al. (2006). "EGFR in colorectal cancer: more than a simple receptor." Ann Oncol **17**(6): 962-7.

Frattini, M., G. Gallino, et al. (2008). "Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer." Cancer Lett **263**(2): 170-81.

Frattini, M., P. Saletti, et al. (2007). "PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients." Br J Cancer **97**(8): 1139-45.

Fumagalli, D., P. G. Gavin, et al. (2010). "A rapid, sensitive, reproducible and cost-effective method for mutation profiling of colon cancer and metastatic lymph nodes." BMC Cancer **10**: 101.

- G -

Garcia-Olmo, D. C., C. Dominguez, et al. (2010). "Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells." Cancer Res **70**(2): 560-7.

Gautschi, O., B. Huegli, et al. (2007). "Origin and prognostic value of circulating KRAS mutations in lung cancer patients." Cancer Lett **254**(2): 265-73.

Gerlinger, M., A. J. Rowan, et al. (2012). "Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing." N Engl J Med **366**(10): 883-92.

Gibson, T. B., A. Ranganathan, et al. (2006). "Randomized phase III trial results of panitumumab, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in metastatic colorectal cancer." Clin Colorectal Cancer **6**(1): 29-31.

Goebel, G., M. Zitt, et al. (2005). "Circulating nucleic acids in plasma or serum (CNAPS) as prognostic and predictive markers in patients with solid neoplasias." Dis Markers **21**(3): 105-20.

Goessl, C. (2003). "Diagnostic potential of circulating nucleic acids for oncology." Expert Rev Mol Diagn **3**(4): 431-42.

Goldstein, N. S. and M. Armin (2001). "Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system." Cancer **92**(5): 1331-46.

Goss, K. H. and J. Groden (2000). "Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor." J Clin Oncol **18**(9): 1967-79.

Grothey, A., A. F. Sobrero, et al. (2012). "Results of a phase III randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial (CORRECT) of regorafenib plus best supportive care (BSC) versus placebo plus BSC in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC) who have progressed after standard therapies." ASCO GI congress. J Clin Oncol **30** (suppl 4; abstr LBA385)

Guadalajara, H., C. Dominguez-Berzosa, et al. (2008). "The concentration of deoxyribonucleic acid in plasma from 73 patients with colorectal cancer and apparent clinical correlations." Cancer Detect Prev **32**(1): 39-44.

- H -

Haigis, K. M., K. R. Kendall, et al. (2008). "Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon." Nat Genet **40**(5): 600-8.

Hara, M., H. Nakanishi, et al. (2008). "Interleukin-2 potentiation of cetuximab antitumor activity for epidermal growth factor receptor-overexpressing gastric cancer xenografts through antibody-dependent cellular cytotoxicity." Cancer Sci **99**(7): 1471-8.

Hebbar, M., A. Wacrenier, et al. (2006). "Lack of usefulness of epidermal growth factor receptor expression determination for cetuximab therapy in patients with colorectal cancer." Anticancer Drugs **17**(7): 855-7.

Hemming, A. W., N. L. Davis, et al. (1992). "Prognostic markers of colorectal cancer: an evaluation of DNA content, epidermal growth factor receptor, and Ki-67." J Surg Oncol **51**(3): 147-52.

Higgins, M. J., D. Jelovac, et al. (2012). "Detection of tumor PIK3CA status in metastatic breast cancer using peripheral blood." Clin Cancer Res **18**(12): 3462-9.

Hill, C. and F. Doyon (2008). "[The frequency of cancer in France: mortality trends since 1950 and summary of the report on the causes of cancer]." Bull Cancer **95**(1): 5-10.

Hisazumi, J., N. Kobayashi, et al. (2004). "Significant role of liver sinusoidal endothelial cells in hepatic uptake and degradation of naked plasmid DNA after intravenous injection." Pharm Res **21**(7): 1223-8.

Hochster, H. S., L. L. Hart, et al. (2008). "Safety and efficacy of oxaliplatin and fluoropyrimidine regimens with or without bevacizumab as first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results of the TREE Study." J Clin Oncol **26**(21): 3523-9.

Holdhoff, M., K. Schmidt, et al. (2009). "Analysis of circulating tumor DNA to confirm somatic KRAS mutations." J Natl Cancer Inst **101**(18): 1284-5.

Horisberger, K., A. Treschl, et al. (2009). "Cetuximab in combination with capecitabine, irinotecan, and radiotherapy for patients with locally advanced rectal cancer: results of a Phase II MARGIT trial." Int J Radiat Oncol Biol Phys **74**(5): 1487-93.

Hurwitz, H., L. Fehrenbacher, et al. (2004). "Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer." N Engl J Med **350**(23): 2335-42.

- I -

Italiano, A., P. Follana, et al. (2008). "Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors for which FISH analysis does not detect an increase in EGFR gene copy number." Ann Surg Oncol **15**(2): 649-54.

- J -

Jacobs, B., W. De Roock, et al. (2009). "Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab." J Clin Oncol **27**(30): 5068-74.

Jahr, S., H. Hentze, et al. (2001). "DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells." Cancer Res **61**(4): 1659-65.

Jhawer, M., S. Goel, et al. (2008). "PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab." Cancer Res **68**(6): 1953-61.

Jonker, D. J., C. J. O'Callaghan, et al. (2007). "Cetuximab for the treatment of colorectal cancer." N Engl J Med **357**(20): 2040-8.

Jope, R. S., C. J. Yuskaitis, et al. (2007). "Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics." Neurochem Res **32**(4-5): 577-95.

Kakimoto, Y., N. Yamamoto, et al. (2008). "Microsatellite analysis of serum DNA in patients with oral squamous cell carcinoma." Oncol Rep **20**(5): 1195-200.

Kawaguchi, Y., K. Kono, et al. (2007). "Cetuximab induce antibody-dependent cellular cytotoxicity against EGFR-expressing esophageal squamous cell carcinoma." Int J Cancer **120**(4): 781-7.

Keyse, S. M. (2008). "Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer." Cancer Metastasis Rev **27**(2): 253-61.

Khambata-Ford, S., C. R. Garrett, et al. (2007). "Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab." J Clin Oncol **25**(22): 3230-7.

Kim, M. J., H. S. Lee, et al. (2012). "Different metastatic pattern according to the KRAS mutational status and site-specific discordance of KRAS status in patients with colorectal cancer." BMC Cancer **12**(1): 347.

Kim, S. Y., E. K. Shim, et al. (2012). "KRAS Mutation Status and Clinical Outcome of Preoperative Chemoradiation With Cetuximab in Locally Advanced Rectal Cancer: A Pooled Analysis of 2 Phase II Trials." Int J Radiat Oncol Biol Phys.

Kim, E. S., R. S. Herbst, et al. (2011). "The BATTLE trial: personalizing therapy for lung cancer." Cancer Discov **1**(1): 44-53.

Kim, E. S., F. R. Khuri, et al. (2001). "Epidermal growth factor receptor biology (IMC-C225)." Curr Opin Oncol **13**(6): 506-13.

Kimura, T., W. S. Holland, et al. (2004). "Mutant DNA in plasma of lung cancer patients: potential for monitoring response to therapy." Ann N Y Acad Sci **1022**: 55-60.

Knijn, N., L. J. Mekenkamp, et al. (2011). "KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients." Br J Cancer **104**(6): 1020-6.

Kuang, Y., A. Rogers, et al. (2009). "Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer." Clin Cancer Res **15**(8): 2630-6.

Kuramochi, H., G. Nakajima, et al. "Amphiregulin and Epiregulin mRNA expression in primary colorectal cancer and corresponding liver metastases." BMC Cancer **12**: 88.

Kurokawa, H. and C. L. Arteaga (2003). "ErbB (HER) receptors can abrogate antiestrogen action in human breast cancer by multiple signaling mechanisms." Clin Cancer Res **9**(1 Pt 2): 511S-5S.

Laurent-Puig, P., G. Manceau, et al. (2012). "Dual blockade of epidermal growth factor receptor-induced pathways: a new avenue to treat metastatic colorectal cancer." J Clin Oncol **30**(13): 1550-2.

Laurent-Puig, P., J. Agostini, et al. (2010). "[Colorectal oncogenesis]." Bull Cancer **97**(11): 1311-21.

Laurent-Puig, P., A. Cayre, et al. (2009). "Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer." J Clin Oncol **27**(35): 5924-30.

Laurent-Puig, P., A. Lievre, et al. (2009). "Mutations and response to epidermal growth factor receptor inhibitors." Clin Cancer Res **15**(4): 1133-9.

Lavoie, J. N., G. L'Allemain, et al. (1996). "Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway." J Biol Chem **271**(34): 20608-16.

Lavon, I., M. Refael, et al. (2010). "Serum DNA can define tumor-specific genetic and epigenetic markers in gliomas of various grades." Neuro Oncol **12**(2): 173-80.

Leary, R. J., I. Kinde, et al. (2010). "Development of personalized tumor biomarkers using massively parallel sequencing." Sci Transl Med **2**(20): 20ra14.

Lecomte, T., A. Berger, et al. (2002). "Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis." Int J Cancer **100**(5): 542-8.

Lee, B. B., E. J. Lee, et al. (2009). "Aberrant methylation of APC, MGMT, RASSF2A, and Wif-1 genes in plasma as a biomarker for early detection of colorectal cancer." Clin Cancer Res **15**(19): 6185-91.

Lefebure, B., F. Charbonnier, et al. (2010). "Prognostic value of circulating mutant DNA in unresectable metastatic colorectal cancer." Ann Surg **251**(2): 275-80.

Lenz, H. J., E. Van Cutsem, et al. (2006). "Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines." J Clin Oncol **24**(30): 4914-21.

Leon, S. A., B. Shapiro, et al. (1977). "Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy." Cancer Res **37**(3): 646-50.

Levidou, G., A. A. Saetta, et al. (2012). "ERK/pERK expression and B-raf mutations in colon adenocarcinomas: correlation with clinicopathological characteristics." World J Surg Oncol **10**: 47.

Li, M., F. Diehl, et al. (2006). "BEAMing up for detection and quantification of rare sequence

variants." Nat Methods **3**(2): 95-7.

Liao, X., T. Morikawa, et al. (2012). "Prognostic role of PIK3CA mutation in colorectal cancer: cohort study and literature review." Clin Cancer Res **18**(8): 2257-68.

Lievre, A., J. B. Bachet, et al. (2008). "KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab." J Clin Oncol **26**(3): 374-9.

Lievre, A., J. B. Bachet, et al. (2006). "KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer." Cancer Res **66**(8): 3992-5.

Lin, J. S., E. M. Webber, et al. (2011). "Systematic review of pharmacogenetic testing for predicting clinical benefit to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer." Am J Cancer Res **1**(5): 650-62.

Lo, Y. M., T. H. Rainer, et al. (2000). "Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients." Clin Chem **46**(3): 319-23.

Lo, Y. M., M. S. Tein, et al. (1998). "Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis." Am J Hum Genet **62**(4): 768-75.

Loupakis, F., A. Ruzzo, et al. (2009). "KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer." Br J Cancer **101**(4): 715-21.

Lugli, A., I. Zlobec, et al. (2006). "Role of the mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3-kinase/AKT pathways downstream molecules, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, and phosphorylated AKT in colorectal cancer-a tissue microarray-based approach." Hum Pathol **37**(8): 1022-31.

Lynch, C. C., H. C. Crawford, et al. (2004). "Epidermal growth factor upregulates matrix metalloproteinase-7 expression through activation of PEA3 transcription factors." Int J Oncol **24**(6): 1565-72.

- M -

Macconail, L. E. and L. A. Garraway (2010). "Clinical implications of the cancer genome." J Clin Oncol **28**(35): 5219-28.

MacConaill, L. E., C. D. Campbell, et al. (2009). "Profiling critical cancer gene mutations in clinical tumor samples." PLoS One **4**(11): e7887.

Mao, C., Y. F. Huang, et al. (2012). "KRAS p.G13D mutation and codon 12 mutations are not created equal in predicting clinical outcomes of cetuximab in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis." Cancer.

Mao, C., Z. Y. Yang, et al. (2011). "PIK3CA exon 20 mutations as a potential biomarker for resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis." Ann Oncol **23**(6): 1518-25.

Markowitz, S. D. and M. M. Bertagnolli (2009). "Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer." N Engl J Med **361**(25): 2449-60.

Massague, J., S. W. Blain, et al. (2000). "TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders." Cell **103**(2): 295-309.

Matar, P., F. Rojo, et al. (2004). "Combined epidermal growth factor receptor targeting with the tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839) and the monoclonal antibody cetuximab (IMC-C225): superiority over single-agent receptor targeting." Clin Cancer Res **10**(19): 6487-501.

Maughan, T. S., R. A. Adams, et al. (2011). "Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial." Lancet **377**(9783): 2103-14.

McBride, D. J., A. K. Orpana, et al. (2010). "Use of cancer-specific genomic rearrangements to quantify disease burden in plasma from patients with solid tumors." Genes Chromosomes Cancer **49**(11): 1062-9.

McDermott, U., D. B. Longley, et al. (2002). "Molecular and biochemical markers in colorectal cancer." Ann Oncol **13 Suppl 4**: 235-45.

Mead, R., M. Duku, et al. (2011). "Circulating tumour markers can define patients with normal colons, benign polyps, and cancers." Br J Cancer **105**(2): 239-45.

Menendez, D., A. Inga, et al. (2009). "The expanding universe of p53 targets." Nat Rev Cancer **9**(10): 724-37.

Migliardi, G., F. Sassi, et al. (2012). "Inhibition of MEK and PI3K/mTOR suppresses tumor growth but does not cause tumor regression in patient-derived xenografts of RAS-mutant colorectal carcinomas." Clin Cancer Res **18**(9): 2515-25.

Misale, S., R. Yaeger, et al. (2012). "Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer." Nature **486**(7404): 532-6.

Molinari, F., V. Martin, et al. (2009). "Differing deregulation of EGFR and downstream proteins in primary colorectal cancer and related metastatic sites may be clinically relevant." Br J Cancer **100**(7): 1087-94.

Montagut, C., A. Dalmases, et al. (2012). "Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer." Nat Med **18**(9): 1445.

Mor, A. and M. R. Philips (2006). "Compartmentalized Ras/MAPK signaling." Annu Rev Immunol **24**: 771-800.

Moroni, M., S. Veronese, et al. (2005). "Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study." Lancet Oncol **6**(5): 279-86.

Mriouah, J., C. Boura, et al. (2010). "Cellular response to cetuximab in PTEN-silenced head and neck squamous cell carcinoma cell line." Int J Oncol **37**(6): 1555-63.



- N -

Naccarati, A., V. Polakova, et al. (2012). "Mutations and polymorphisms in TP53 gene--an overview on the role in colorectal cancer." Mutagenesis **27**(2): 211-8.

Nagata, Y., K. H. Lan, et al. (2004). "PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients." Cancer Cell **6**(2): 117-27.

Nawroz, H., W. Koch, et al. (1996). "Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients." Nat Med **2**(9): 1035-7.

Negri, F. V., C. Bozzetti, et al. "PTEN status in advanced colorectal cancer treated with cetuximab." Br J Cancer **102**(1): 162-4.

Nicholson, R. I., J. M. Gee, et al. (2001). "EGFR and cancer prognosis." Eur J Cancer **37 Suppl 4**: S9-15.

Noro, R., A. Gemma, et al. (2006). "Gefitinib (IRESSA) sensitive lung cancer cell lines show phosphorylation of Akt without ligand stimulation." BMC Cancer **6**: 277.

- O -

Oden-Gangloff, A., F. Di Fiore, et al. (2009). "TP53 mutations predict disease control in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab-based chemotherapy." Br J Cancer **100**(8): 1330-5.

Ogino, S., T. Kawasaki, et al. (2007). "Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample." J Mol Diagn **9**(3): 305-14.

Osborne, C. K. and C. L. Arteaga (2003). "Role of molecular and genetic markers in breast cancer treatment decisions." J Clin Oncol **21**(23 Suppl): 285s-287s.

Otsuka, K., R. Satoyoshi, et al. (2012). "Acquired/intratumoral mutation of KRAS during metastatic progression of colorectal carcinogenesis." Oncol Lett **3**(3): 649-653.

- P -

- Paez, D., L. Pare, et al. (2010). "Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and KRAS mutations: are they useful biomarkers of clinical outcome in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR-based therapy?" Cancer Sci **101**(9): 2048-53.
- Paez, J. G., P. A. Janne, et al. (2004). "EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy." Science **304**(5676): 1497-500.
- Pao, W., T. Y. Wang, et al. (2005). "KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib." PLoS Med **2**(1): e17.
- Park, S. J., Y. S. Hong, et al. (2010). "Genetic polymorphisms of FcγRIIIa and FcγRIIIb are not predictive of clinical outcomes after cetuximab plus irinotecan chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer." Oncology **82**(2): 83-9.
- Parsons, R., L. L. Myeroff, et al. (1995). "Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer." Cancer Res **55**(23): 5548-50.
- Paz-Ares, L. G., C. Gomez-Roca, et al. (2012). "Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic dose-escalation study of RG7160 (GA201), the first glycoengineered monoclonal antibody against the epidermal growth factor receptor, in patients with advanced solid tumors." J Clin Oncol **29**(28): 3783-90.
- Peeters, M., A. Cohn, et al. (2012). "Panitumumab in combination with cytotoxic chemotherapy for the treatment of metastatic colorectal carcinoma." Clin Colorectal Cancer **11**(1): 14-23.
- Peeters M, Douillard JY, Van Cutsem E, et al. (2011). Evaluation of individual codon 12 and 13 mutant (MT) KRAS alleles as prognostic and predictive biomarkers of response to panitumumab (pmab) in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress. Abstract 33LBA.
- Peeters, M., T. J. Price, et al. (2010). "Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer." J Clin Oncol **28**(31): 4706-13.
- Pekin, D., Y. Skhiri, et al. (2011). "Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics." Lab Chip **11**(13): 2156-66.
- Penault-Llorca, F., A. Cayre, et al. (2006). "Is there an immunohistochemical technique definitively valid in epidermal growth factor receptor assessment?" Oncol Rep **16**(6): 1173-9.
- Perrone, F., A. Lampis, et al. (2009). "PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients." Ann Oncol **20**(1): 84-90.
- Personeni, N., S. Fieuws, et al. (2008). "Clinical usefulness of EGFR gene copy number as a predictive marker in colorectal cancer patients treated with cetuximab: a fluorescent in situ hybridization study." Clin Cancer Res **14**(18): 5869-76.
- Powell, S. M., N. Zilz, et al. (1992). "APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis." Nature **359**(6392): 235-7.
- Prahallad, A., C. Sun, et al. (2012). "Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E)

inhibition through feedback activation of EGFR." Nature **483**(7387): 100-3.

Prior IA, Hancock JF. (2012). "Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling." Semin Cell Dev Biol **23**(2):145-53.

- R -

Rajagopalan, H., M. A. Nowak, et al. (2003). "The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer." Nat Rev Cancer **3**(9): 695-701.

Ribic, C. M., D. J. Sargent, et al. (2003). "Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer." N Engl J Med **349**(3): 247-57.

Richman, S. D., P. Chambers, et al. (2011). "Intra-tumoral heterogeneity of KRAS and BRAF mutation status in patients with advanced colorectal cancer (aCRC) and cost-effectiveness of multiple sample testing." Anal Cell Pathol (Amst) **34**(1-2): 61-6.

Roychowdhury, S., M. K. Iyer, et al. (2011). "Personalized oncology through integrative high-throughput sequencing: a pilot study." Sci Transl Med **3**(111): 111ra121.

Ryan, B. M., F. Lefort, et al. (2003). "A prospective study of circulating mutant KRAS2 in the serum of patients with colorectal neoplasia: strong prognostic indicator in postoperative follow up." Gut **52**(1): 101-8.

- S -

Salazar, R., E. Mini, et al. (2012). "Adjuvant FOLFOX4 plus or minus cetuximab (cmab) in patients (pts) with KRAS mutant (mKRAS) resected stage III colon cancer (cc). Results from the PETACC8 intergroup trial." ESMO congress 2012, Abstract 5200. Annals of Oncology **23** (Supplement 9): ix178–ix223.

Saltz, L. B., N. J. Meropol, et al. (2004). "Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor." J Clin Oncol **22**(7): 1201-8.

Samuels, Y., Z. Wang, et al. (2004). "High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers." Science **304**(5670): 554.

Santini, D., F. Loupakis, et al. (2008). "High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice." Oncologist **13**(12): 1270-5.

Sartore-Bianchi, A., M. Martini, et al. (2009). "PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies." Cancer Res **69**(5): 1851-7.

Scaltriti, M. and J. Baselga (2006). "The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy." Clin Cancer Res **12**(18): 5268-72.

Scartozzi, M., R. Giampieri, et al. (2012). "Phosphorylated AKT and MAPK expression in primary tumours and in corresponding metastases and clinical outcome in colorectal cancer patients receiving irinotecan-cetuximab." J Transl Med **10**: 71.

Scartozzi, M., I. Bearzi, et al. (2007). "Epidermal growth factor receptor (EGFR) downstream signalling pathway in primary colorectal tumours and related metastatic sites: optimising EGFR-targeted treatment options." Br J Cancer **97**(1): 92-7.

Scartozzi, M., I. Bearzi, et al. (2004). "Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors does not correlate with EGFR expression in related metastatic sites: implications for treatment with EGFR-targeted monoclonal antibodies." J Clin Oncol **22**(23): 4772-8.

Schmitz, K. J., H. Lang, et al. (2007). "Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for overall survival in intrahepatic cholangiocarcinoma." Virchows Arch **450**(2): 135-41.

Schrag, D. (2004). "The price tag on progress--chemotherapy for colorectal cancer." N Engl J Med **351**(4): 317-9.

Schwarzenbach, H., D. S. Hoon, et al. (2011). "Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients." Nat Rev Cancer **11**(6): 426-37.

Schwarzenbach, H., J. Stoehlmacher, et al. (2008). "Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer." Ann N Y Acad Sci **1137**: 190-6.

Shao, Z. M., J. Wu, et al. (2001). "p53 mutation in plasma DNA and its prognostic value in breast cancer patients." Clin Cancer Res **7**(8): 2222-7.

Shia, J., D. S. Klimstra, et al. (2005). "Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study." Mod Pathol **18**(10): 1350-6.

Shigematsu, H., L. Lin, et al. (2005). "Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers." J Natl Cancer Inst **97**(5): 339-46.

Shinozaki, M., S. J. O'Day, et al. (2007). "Utility of circulating B-RAF DNA mutation in serum for monitoring melanoma patients receiving biochemotherapy." Clin Cancer Res **13**(7): 2068-74.

Shuptrine, C. W., R. Surana, et al. (2012). "Monoclonal antibodies for the treatment of cancer." Semin Cancer Biol **22**(1): 3-13.

Sobrero, A. F., J. Maurel, et al. (2008). "EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer." J Clin Oncol **26**(14): 2311-9.

Sood, A., D. McClain, et al. (2012). "PTEN gene expression and mutations in the PIK3CA gene as predictors of clinical benefit to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer." Clin Colorectal Cancer **11**(2): 143-50.

Sorenson, G. D. (2000). "Detection of mutated KRAS2 sequences as tumor markers in

plasma/serum of patients with gastrointestinal cancer." Clin Cancer Res **6**(6): 2129-37.

Sozzi, G., L. Roz, et al. (2005). "Effects of prolonged storage of whole plasma or isolated plasma DNA on the results of circulating DNA quantification assays." J Natl Cancer Inst **97**(24): 1848-50.

Sozzi, G., D. Conte, et al. (2001). "Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients." Cancer Res **61**(12): 4675-8.

Spano, J. P., C. Lagorce, et al. (2005). "Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival." Ann Oncol **16**(1): 102-8.

Sparks, A. B., P. J. Morin, et al. (1998). "Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer." Cancer Res **58**(6): 1130-4.

Spindler, K. L., N. Pallisgaard, et al. (2012). "Quantitative cell-free DNA, KRAS, and BRAF mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan." Clin Cancer Res **18**(4): 1177-85.

Stintzing, S., C. Kapaun, et al. (2012). "Prognostic value of cetuximab-related skin toxicity in metastatic colorectal cancer patients and its correlation with parameters of the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway: Results from a randomized trial of the GERMAN AIO CRC Study Group." Int J Cancer.

Su, Y. H., M. Wang, et al. (2008). "Detection of mutated K-ras DNA in urine, plasma, and serum of patients with colorectal carcinoma or adenomatous polyps." Ann N Y Acad Sci **1137**: 197-206.

Szpechcinski, A., R. Struniawska, et al. (2008). "Evaluation of fluorescence-based methods for total vs. amplifiable DNA quantification in plasma of lung cancer patients." J Physiol Pharmacol **59 Suppl 6**: 675-81.

- T -

Tabernero, J., F. Rojo, et al. (2008). "Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors." J Clin Oncol **26**(10): 1603-10.

Takayama, T., K. Miyanishi, et al. (2006). "Colorectal cancer: genetics of development and metastasis." J Gastroenterol **41**(3): 185-92.

Taly, V., D. Pekin, et al. (2012). "Detecting biomarkers with microdroplet technology." Trends Mol Med **18**(7): 405-16.

Taniguchi, K., J. Uchida, et al. (2011). "Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas." Clin Cancer Res **17**(24): 7808-15.

Tejpar, S., I. Celik, et al. (2012). "Association of KRAS G13D Tumor Mutations With Outcome in Patients With Metastatic Colorectal Cancer Treated With First-Line Chemotherapy With or Without Cetuximab." J Clin Oncol **30**(29): 3570-7.

Tenbaum, S. P., P. Ordonez-Moran, et al. (2012). "beta-catenin confers resistance to PI3K and AKT inhibitors and subverts FOXO3a to promote metastasis in colon cancer." Nat Med **18**(6): 892-901.

Thierry, A. R., F. Mouliere, et al. (2010). "Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts." Nucleic Acids Res **38**(18): 6159-75.

Toulany, M., K. Dittmann, et al. (2005). "Radioresistance of K-Ras mutated human tumor cells is mediated through EGFR-dependent activation of PI3K-AKT pathway." Radiother Oncol **76**(2): 143-50.

Trevisiol, C., F. Di Fabio, et al. (2006). "Prognostic value of circulating KRAS2 gene mutations in colorectal cancer with distant metastases." Int J Biol Markers **21**(4): 223-8.

Tsao, M. S., A. Sakurada, et al. (2005). "Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome." N Engl J Med **353**(2): 133-44.

Tveit, K. M., T. Guren, et al. (2012). "Phase III trial of cetuximab with continuous or intermittent fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (Nordic FLOX) versus FLOX alone in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: the NORDIC-VII study." J Clin Oncol **30**(15): 1755-62.

- U -

Umetani, N., J. Kim, et al. (2006). "Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats." Clin Chem **52**(6): 1062-9.

- V -

Vallbohmer, D., W. Zhang, et al. (2005). "Molecular determinants of cetuximab efficacy." J Clin Oncol **23**(15): 3536-44.

Van Cutsem, E., S. Tejpar, et al. (2012). "Inpatient cetuximab dose escalation in metastatic colorectal cancer according to the grade of early skin reactions: the randomized EVEREST study." J Clin Oncol **30**(23): 2861-8.

Van Cutsem, E., C. H. Kohne, et al. (2009). "Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer." N Engl J Med **360**(14): 1408-17.

Van Cutsem, E., M. Peeters, et al. (2007). "Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer." J Clin Oncol **25**(13): 1658-64.

Van der Auwera, I., H. J. Elst, et al. (2009). "The presence of circulating total DNA and methylated genes is associated with circulating tumour cells in blood from breast cancer patients." Br J Cancer **100**(8): 1277-86.

van der Drift, M. A., B. E. Hol, et al. (2009). "Circulating DNA is a non-invasive prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer." Lung Cancer **68**(2): 283-7.

van der Vaart, M., D. V. Semenov, et al. (2009). "Characterisation of circulating DNA by parallel tagged sequencing on the 454 platform." Clin Chim Acta **409**(1-2): 21-7.

van Puijenbroek, M., J. W. Dierssen, et al. (2005). "Mass spectrometry-based loss of heterozygosity analysis of single-nucleotide polymorphism loci in paraffin embedded tumors using the MassEXTEND assay: single-nucleotide polymorphism loss of heterozygosity analysis of the protein tyrosine phosphatase receptor type J in familial colorectal cancer." J Mol Diagn **7**(5): 623-30.

van Zandwijk, N., A. Mathy, et al. (2007). "EGFR and KRAS mutations as criteria for treatment with tyrosine kinase inhibitors: retro- and prospective observations in non-small-cell lung cancer." Ann Oncol **18**(1): 99-103.

Vilar, E. and J. Taberero. (2012). "Cancer: Pinprick diagnostics." Nature **486**(7404): 482-3.

Vitzthum, F., G. Geiger, et al. (1999). "A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system." Anal Biochem **276**(1): 59-64.

Vogelstein, B., E. R. Fearon, et al. (1988). "Genetic alterations during colorectal-tumor development." N Engl J Med **319**(9): 525-32.

- W -

Wang, S., T. An, et al. (2010). "Potential clinical significance of a plasma-based KRAS mutation analysis in patients with advanced non-small cell lung cancer." Clin Cancer Res **16**(4): 1324-30.

Watcharasit, P., G. N. Bijur, et al. (2002). "Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3beta and p53 after DNA damage." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 7951-5.

Weickhardt, A. J., T. J. Price, et al. (2012). "Dual targeting of the epidermal growth factor receptor using the combination of cetuximab and erlotinib: preclinical evaluation and results of the phase II DUX study in chemotherapy-refractory, advanced colorectal cancer." J Clin Oncol **30**(13): 1505-12.

Weisenberger, D. J., K. D. Siegmund, et al. (2006). "CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer." Nat Genet **38**(7): 787-93.

Wells, A. (1999). "EGF receptor." Int J Biochem Cell Biol **31**(6): 637-43.

Wu, J., J. P. Issa, et al. (1993). "Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyltransferase gene induces transformation of NIH 3T3 cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(19): 8891-5.

- X -

Xue, X., M. D. Teare, et al. (2009). "Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum." Clin Chim Acta **404**(2): 100-4.

- Y -

Yang, H., B. Higgins, et al. (2012). "Antitumor activity of BRAF inhibitor vemurafenib in preclinical models of BRAF-mutant colorectal cancer." Cancer Res **72**(3): 779-89.

Yarden, Y. (2001). "The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities." Eur J Cancer **37 Suppl 4**: S3-8.

Yeh, J. J., E. D. Routh, et al. (2009). "KRAS/BRAF mutation status and ERK1/2 activation as biomarkers for MEK1/2 inhibitor therapy in colorectal cancer." Mol Cancer Ther **8**(4): 834-43.

Yen, L. C., Y. H. Uen, et al. (2010). "Activating KRAS mutations and overexpression of epidermal growth factor receptor as independent predictors in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab." Ann Surg **251**(2): 254-60.

Yen, L. C., Y. S. Yeh, et al. (2009). "Detection of KRAS oncogene in peripheral blood as a predictor of the response to cetuximab plus chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer." Clin Cancer Res **15**(13): 4508-13.

- Z -

Zhang, W., M. Gordon, et al. (2007). "FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab." J Clin Oncol **25**(24): 3712-8.

Zhong, X. Y., I. von Muhlenen, et al. (2007). "Increased concentrations of antibody-bound circulatory cell-free DNA in rheumatoid arthritis." Clin Chem **53**(9): 1609-14.

Zhou, B. P., J. Deng, et al. (2004). "Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition." Nat Cell Biol **6**(10): 931-40.



