

# Actualités sur les biomarqueurs en France

*News about biomarker analysis in France*

M. Beau-Faller\*, A. Boyer\*\*, É. Guérin\*, C. Fournier\*\*, D. Reita\*, F. Barlesi\*\*

La médecine de précision représente le quotidien des attentes des malades atteints de cancer bronchique et des cliniciens. Sur quels biomarqueurs sont fondés les stratégies de routine et les essais cliniques aujourd'hui ? Quels sont les prélèvements sur lesquels ces analyses peuvent ou doivent être conduites ? Quelles techniques sont possibles et qu'en attendre ? Cet article synthétise les connaissances actuelles pour répondre à ces questions.

## Quels biomarqueurs doivent être évalués en routine ?

Depuis la découverte du gène de l'EGFR, en 2004, et les progrès en biologie moléculaires, les thérapies ciblées ont considérablement modifié la prise en charge des patients présentant des *drivers* oncogéniques.

### Mutations de l'EGFR

Les mutations de l'EGFR ont un rôle prédictif de la sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinases (ITK) de l'EGFR dans les cancers bronchiques et sont présentes chez 11 % des patients atteints d'un cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) [1]. La plupart (90 %) de ces mutations sont des délétions de l'exon 19 et des mutations ponctuelles de l'exon 21 (L858R) [2], plus fréquemment détectées dans les adénocarcinomes, et rarement dans les carcinomes épidermoïdes (moins de 5 % des cas). Par ailleurs, ces mutations sont le plus souvent retrouvées chez les femmes, les patients d'origine asiatique, les non-fumeurs (3). Leur prévalence est de 11 % chez les patients atteints d'un CBNPC. De nombreuses études de phase III ont démontré la supériorité des ITK de l'EGFR sur la chimiothérapie à base de sel de platine en première ligne thérapeutique. Le géfitinib (4), l'erlotinib et l'afatinib (5)

ont donc l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en première ligne de traitement, avec une survie sans progression (SSP) de 12 mois.

Les tumeurs présentant une mutation activatrice de l'EGFR, après une réponse ou une stabilisation de la maladie, développent très souvent une résistance. La mutation T790M est le mécanisme de résistance acquis secondairement dans plus de 50 % des cas. Il s'agit d'un blocage stérique du site de fixation des ITK de l'EGFR de première et de deuxième génération. L'osimertinib, ITK de l'EGFR de troisième génération, a montré un très bon taux de réponse (SSP de 10 mois) lorsque cette mutation est présente (6). Les autres mécanismes de résistance aux ITK de l'EGFR de première et de deuxième génération mis en évidence sont des mutations de KRAS, des amplifications de c-MET, des amplifications d'HER2, des polymorphismes de BIM, une expression élevée d'IGF1R, ou encore des transformations histologiques en carcinomes à petites cellules (CBPC).

### Réarrangements du gène ALK

Le réarrangement d'ALK confère une sensibilité importante au crizotinib, ITK d'ALK de première génération découvert en 2007. Ce réarrangement est présent chez 5 % des patients ayant un CBNPC (1), principalement chez des jeunes, non fumeurs, porteurs d'un adénocarcinome (2). Les réarrangements les plus fréquents résultent d'une inversion au niveau du bras court du chromosome 2 et d'une fusion avec la protéine EML4, responsable d'une activité tyrosine kinase permanente. Des partenaires autres que EML4 ont été rapportés, tels que TFG, KIF5B ou KLC1. Les patients traités par crizotinib en première ligne thérapeutique ont ainsi une SSP de 10,9 mois, contre 7 mois pour ceux traités par chimiothérapie ( $p < 0,001$ ) [7]. Plus récemment, le céritinib, un anti-ALK de deuxième génération, a également eu l'AMM en première ligne de traite-

\* Université de Strasbourg ; centre hospitalier universitaire de Strasbourg.

\*\* Aix Marseille Université ; AP-HM, Marseille.

# Résumé

Depuis la découverte du gène de l'EGFR en 2004, le développement des thérapeutiques ciblées et les progrès de la biologie moléculaire ont considérablement modifié la prise en charge des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC). Les biomarqueurs actuellement recherchés en routine et ciblables sont notamment les mutations du gène EGFR, les réarrangements du gène ALK et du gène ROS1 ainsi que les mutations du gène BRAF. Le développement de nouvelles techniques de biologie moléculaire en routine plus sensibles ou plus globales (PCR digitale, NGS ciblé) permettra de faire évoluer les connaissances des biomarqueurs relevant dans les CBNPC.

ment après les résultats de l'étude ASCEND 4 (8). Des mécanismes de résistance ont été identifiés après traitement par crizotinib. L1152R, C1156Y, F1174L, L1196M, D1203N, G1269A sont les mutations secondaires le plus fréquemment retrouvées. D'autres mécanismes de résistance impliquent d'autres gènes : mutation de l'EGFR, mutation de KRAS, amplification de c-MET.

Les ITK d'ALK de deuxième génération ont donc été testés, parmi lesquels le céritinib, l'alectinib, le brigatinib et le lorlatinib. Actuellement, seul le céritinib a obtenu une AMM en deuxième ligne ; les autres traitements sont disponibles en autorisation temporaire d'utilisation (ATU).

## Réarrangements de ROS1

ROS1 appartient à la famille des récepteurs de l'insuline et entraîne une activation de la cascade de signalisation des MAP kinases. La fusion de ROS1 avec un partenaire conduit à l'activation constitutive de l'activité kinase. Les réarrangements de ROS1 sont présents chez 2 % des patients porteurs d'un CBNPC, préférentiellement des adénocarcinomes. Ces patients sont jeunes, d'origine asiatique et non fumeurs. Le crizotinib a également montré une bonne efficacité en première ligne, avec une SSP de 9,1 mois (9, 10). Les mécanismes de résistance sont générés par l'apparition de mutations du gène ROS1 (la plus fréquente est G2032R), ou impliquant d'autres gènes (EGFR, en particulier). Le lorlatinib, ITK d'ALK de deuxième génération, a montré des résultats prometteurs en phase I (11).

## Mutations de BRAF

Ces mutations sont rares dans le CBNPC (2 à 4 % des cas) [1]. Les plus fréquentes sont les mutations V600E (30,8 %), G469A (23,1 %) et K601E (15,4 %). Elles sont plus particulièrement retrouvées dans les adénocarcinomes et chez les fumeurs. Comme dans le traitement du mélanome, le vémurafénib ainsi que le dabrafénib sont actifs en cas de mutation V600E, mais c'est l'association dabrafénib + tramétinib qui a obtenu l'AMM en cas de mutation V600E, avec un

taux de réponse de 64 %, en première ligne thérapeutique (12). Notons que les mutations de BRAF présentent une résistance aux ITK de l'EGFR.

## Quels biomarqueurs peuvent être évalués en recherche clinique ?

En complément des biomarqueurs recherchés en pratique clinique, d'autres caractéristiques moléculaires de la tumeur ou de son microenvironnement pourraient permettre de sélectionner les patients susceptibles d'avoir des taux de réponses très élevés et de présenter des toxicités nettement inférieures à celles des anciens traitements standard.

Concernant l'utilisation des antiangiogéniques, et particulièrement du bévacizumab (seul antiangiogénique à avoir actuellement une AMM dans le CBNPC), aucun biomarqueur prédictif de leur efficacité n'a pu être mis en évidence de façon robuste pour améliorer l'efficacité et la sélection des patients recevant ces traitements. Cependant, l'étude ECOG 4599 a montré le bénéfice de l'ajout du bévacizumab à un doublet de chimiothérapie : un taux élevé de VEGF plasmatique était corrélé à une meilleure réponse, sans conséquence sur la survie (13, 14). Ainsi, il est nécessaire que les différents essais cliniques évaluant des antiangiogéniques continuent de chercher à mettre en évidence un biomarqueur robuste prédictif de l'efficacité des antiangiogéniques. Parmi les biomarqueurs de l'angiogenèse le plus fréquemment testés, on peut citer le VEGF-A, bFGF, ICAM, E-selectin, Ang1 et Tie2, qui peuvent être recherchés au niveau tissulaire ou plasmatique. Actuellement, un essai de phase II évalue l'impact prédictif d'une amplification du gène FGFR1 sur l'efficacité du nintédanib dans le CBNPC de type épidermoïde (15).

La recherche d'altérations moléculaires qui sont potentiellement des *drivers* oncogéniques permet l'accès des patients à des thérapies ciblées, dont certaines ont une AMM, comme nous l'avons vu précédemment. D'autres thérapies ciblées sont en cours de développement dans la prise en charge d'altérations moléculaires, dont le caractère prédictif

# Mots-clés

Cancer bronchique non à petites cellules

Biomarqueurs

Mutations de l'EGFR et de BRAF

Réarrangements d'ALK et de ROS1

Biologie moléculaire

NGS

## Summary

*Since the discovery of the EGFR gene in 2004, the development of targeted therapeutics and advances in molecular biology have significantly improve the management of non-small cell lung cancer (NSCLC).*

*Biomarkers currently routinely searched and targetable include EGFR gene mutations, ALK and ROS1 gene rearrangements, and BRAF gene mutations.*

*The development of new molecular biology techniques in routine which appears more sensitive or more global (digital PCR, targeted NGS) will help for the knowledge of biomarkers relevant in NSCLC.*

## Keywords

*Non-small cell cancer*

*Biomarkers*

*EGFR, BRAF mutations*

*ALK, ROS1 rearrangements*

*Molecular biology*

*Digital PCR*

*New Generation Sequencing*

reste à prouver. Cela implique que ces altérations moléculaires ne sont pas à rechercher en routine. Parmi ces altérations moléculaires, les réarrangements du gène NTRK sont retrouvés dans 1 à 3 % des CBNPC, principalement chez des patients tabagiques (16). Le diagnostic de réarrangement du gène NTRK peut être obtenu par FISH ou NGS. Ces réarrangements, qui semblent mutuellement exclusifs d'autres mutations, touchent principalement le gène NTRK1, qui code pour le récepteur TRKA ; mais peuvent également toucher les gènes NTRK2 et NTRK3, qui codent respectivement pour les récepteurs TRKB et TRKC (17). Des données précliniques suggèrent que le récepteur TRKA (qui est codé par le gène NTRK1) pourrait être ciblé par différents ITK, dont le crizotinib, sur des lignées cellulaires de CBNPC (16).

Récemment, une étude de phase I a mis en évidence une activité antitumorale de l'entrectinib (multi-kinase inhibitrice ayant une activité sur les récepteurs TRK, ALK et ROS1) chez des patients atteints d'un CBNPC avec un réarrangement des gènes NTRK1, NTRK2 ou NTRK3 (18). Des réponses ont également été rapportées avec le LOXO-101 (pan-inhibiteur des TRK) dans un essai de phase I ayant inclus un patient porteur d'un CBNPC et présentant un réarrangement de NTRK1 (19). Des études de phase II ciblant les gènes NTRK1, NTRK2 et NTRK3 dans différents organes sont en cours pour l'entrectinib, le cabozantinib et le LOXO-101.

Les mutations de Met se situent au niveau du site d'épissage de l'exon 14 et sont retrouvées dans environ 3 % des CBNPC, avec une fréquence accrue en cas de carcinome sarcomatoïde (20). Ces mutations confèrent une sensibilité aux inhibiteurs de Met que sont le crizotinib et le cabozantinib, et des réponses ont été rapportées (21). Contrairement à la recherche d'une mutation de c-Met au niveau de l'exon 14, qui est recommandée, la recherche d'une amplification de Met est à réaliser en dehors de la recherche clinique si l'on observe une progression après un traitement par ITK de l'EGFR de première génération ou s'il y a accord des plateformes de biologie moléculaire (22).

Les amplifications de Met sont présentes dans environ 4 % des CBNPC. Les résultats du programme ACSé de l'Institut national du cancer (INCa), qui a évalué le crizotinib dans les amplifications de Met, sont en attente, mais des cas de réponse ont été rapportés (23).

Les réarrangements de RET sont présents dans 1 à 2 % des CBNPC, principalement chez des sujets jeunes et non fumeurs, et sont mutuellement exclusifs de la présence d'autres mutations (24).

La recherche d'un réarrangement de RET peut être réalisée par immunohistochimie (IHC), FISH, RT-PCR ou NGS. Celle-ci n'est pas recommandée en pratique courante, mais peut être réalisée après accord de la plateforme de biologie moléculaire. Parmi les molécules ciblant ce réarrangement, des essais de phase II ont montré des résultats encourageants, avec des taux de réponses de 28 % pour le cabozantinib et de 53 % pour le vandétanib, et une médiane de SSP de 4,7 mois pour le vandétanib (25, 26). Ces résultats sont néanmoins inférieurs à ce que l'on observe habituellement avec les thérapies ciblées ; d'autres molécules très spécifiques de RET sont actuellement développées, et l'on a notamment observé des cas de réponse cérébrale avec le LOX-292 chez des patients évoluant sous d'autres inhibiteurs de RET (27).

La recherche d'une mutation du gène PIK3CA n'est pas recommandée en routine, du fait de l'absence de traitement disponible. Les résultats des traitements ciblant PIK3CA se sont avérés décevants, notamment pour le buparlisib dans le cadre d'une étude de phase II où le taux de SSP à 12 semaines est de 23 % chez les patients atteints d'un carcinome épidermoïde et de 20 % chez les patients atteints d'un CBNPC non épidermoïde (28). Cette anomalie moléculaire est présente dans environ 1 % des CBNPC (29), et sa recherche doit être réalisée uniquement dans le cadre de la recherche clinique. Bien qu'elle soit systématique, la recherche d'une mutation de KRAS ne permet pas l'accès à une thérapie ciblée. Les mutations de cet oncogène situé sur le chromosome 12 sont présentes dans environ 25 % des CBNPC, avec une incidence augmentée chez les fumeurs (30). La présence d'un CBNPC avec une mutation du gène KRAS est associée à un pronostic défavorable. On note l'échec d'une association sélumétinib (thérapie ciblée anti-MEK qui est située en aval de RAS sur la voie des MAP kinases) + docétaxel comparativement au docétaxel seul chez les patients atteints d'un CBNPC à KRAS muté (31). En revanche, la présence d'une mutation de KRAS semble conférer une sensibilité accrue aux inhibiteurs de *checkpoints* immunitaires, en lien avec une augmentation de la charge mutationnelle chez ces patients (32).

Les mutations du gène HER2 sont présentes chez environ 2 % des patients atteints de CBNPC de stade avancé, plus fréquemment chez les femmes et les non fumeurs (33). Une mutation du gène HER2 au niveau de l'exon 20 fait partie du panel des mutations recherchées en routine par les plateformes de biologie moléculaire, bien qu'aucune thérapie ciblée n'ait montré un bénéfice dans cette situation.

Néanmoins, le trastuzumab (anticorps monoclonal anti-HER2) semble présenter une activité antitumorale chez certains de ces patients, en association avec une chimiothérapie (34). Des essais thérapeutiques sont en cours chez ces patients ayant une mutation de HER2, avec évaluation, notamment, du T-DM1; les résultats préliminaires d'une étude en "basket" présentés récemment à la WCLC ont retrouvé un taux de réponses de 44 % et une médiane de SSP de 4 mois pour le sous-groupe des patients atteints d'un CBNPC avec mutation de HER2 (35). D'autres études évaluant le T-DM1 dans cette indication sont en cours (36).

Les significations biologiques des surexpressions de HER2 détectées en IHC ou des amplifications détectées grâce à la FISH sont différentes de celles des mutations du gène HER2, et seule la mutation de HER2 est un activateur oncogénique démontré in vitro. Des résultats prometteurs ont cependant été retrouvés avec le T-DM1, avec un taux de réponses de 50 % pour 6 patients ayant une amplification de HER2 dans des résultats présentés récemment (35). Concernant le CBPC, très peu de données moléculaires sont disponibles. On sait néanmoins depuis peu que la protéine DLL3 (*Delta Like Protein 3*), qui inhibe la voie NOTCH-1, est surexprimée dans environ 80 % des CBPC. Les CBPC qui présentent un taux élevé de DLL3 semblent toucher le plus souvent des hommes, fumeurs et qui présentent des tumeurs positives pour le TTF1 (37).

Des résultats encourageants ont été retrouvés dans le cadre d'une étude de phase I avec le rovalpituzumab tésirine, qui associe un anticorps anti-DLL3 au pyrrolobenzodiazépine dimer, un agent anticancéreux cytotoxique, qui crée des cassures de l'ADN. En effet, 39 % des patients déjà traités exprimant le DLL3 ont présenté une réponse à cette molécule (38). Une étude de phase III est en cours et compare cette molécule au topotécan chez les patients porteurs d'un CBPC ayant progressé après une chimiothérapie à base de sels de platine et exprimant le DLL3.

Concernant l'immunothérapie, d'autres biomarqueurs que PD-L1 sont en cours d'évaluation. Parmi ceux-ci, la charge mutationnelle tumorale pourrait être une option intéressante à condition d'harmoniser les techniques, de déterminer les seuils de positivité et de déterminer les gènes à étudier. Cette charge mutationnelle peut être quantifiée sur la tumeur ou sur de l'ADN tumoral circulant (ADNtc). Des résultats récemment présentés à l'ESMO suggèrent qu'une charge mutationnelle élevée sur de l'ADNtc était associée à un bénéfice

en SSP, en faveur de l'atézolizumab (anti-PD-L1) comparativement au docétaxel, alors qu'une charge mutationnelle basse ne l'était pas (39).

## Échantillons à tester et précautions préanalytiques à prendre

### Quels échantillons ?

#### ◆ Échantillons tissulaires et cytologiques

Presque tous les types de prélèvements tissulaires ou cytologiques de tumeurs de CBNPC non épidermoïdes localement avancés ou métastatiques peuvent être utilisés pour la réalisation d'un génotypage en routine, à l'exception des métastases osseuses traitées par un décalcifiant fort (type acide chlorhydrique 3-4 % qui fragmente l'ADN), à condition de répondre à des critères de qualité suffisants. Le challenge tient au fait de disposer de suffisamment de matériel tissulaire, non seulement pour le diagnostic histopathologique, mais aussi pour la recherche des biomarqueurs de routine, en évitant si possible d'épuiser le matériel qui pourra être indispensable pour l'inclusion dans certains essais thérapeutiques. Il est d'ailleurs recommandé de réaliser d'emblée toutes les coupes blanches nécessaires dans une perspective d'économie du matériel (40). Ces prélèvements tumoraux sont obtenus, si possible, sur la tumeur primitive, par des biopsies bronchiques réalisées lors d'une fibroscopie bronchique – au moins 3 biopsies –, par des ponctions-biopsies ganglionnaires réalisées sous échographie (*Endobronchial Ultrasound guided-Transbronchial Needle Aspiration* [EBUS-TBNA]), ou par des ponctions-biopsies pulmonaires sous scanner. Le *testing* par génotypage des pièces opératoires de carcinome non épidermoïde n'est actuellement pas recommandé par l'INCa, à l'exception des situations de rechute où le seul prélèvement histologique analysable serait la pièce opératoire et à condition qu'il n'y ait pas eu de traitement adjuvant (41).

Les échantillons cytologiques – liquides de lavage bronchoalvéolaire, lavage bronchique, liquides pleuraux, prélèvements de liquide céphalo-rachidien (LCR), cytologies obtenues par EBUS –, sont utilisables pour le génotypage et la détection des translocations par FISH, avec une préférence pour les inclusions cellulaires en bloc plutôt que les étalements sur lames. Il peut être plus rentable

d'analyser en génotypage un échantillon cytologique qu'un échantillon tissulaire pauvre en cellules tumorales.

Plus récemment, il a été montré que des analyses moléculaires de surnageant de liquides pleuraux, de LCR ou de prélèvements par EBUS seraient possibles pour peu qu'on utilise une technique appropriée, suffisamment sensible (42). Pour un diagnostic moléculaire initial, l'analyse de la tumeur primitive ou d'une métastase (hors os) serait équivalente. Lorsque le diagnostic est réalisé sur des échantillons de petite taille, comme les biopsies ou un prélèvement cytologique, et que le pathologiste ne peut formellement exclure une composante adénocarcinome associée à un carcinome épidermoïde ou à petites cellules, il est possible de demander un génotypage, tout comme en présence d'un carcinome épidermoïde en cas de données cliniques particulières (sujet jeune, peu ou non fumeur, etc.). En cas de prélèvement non analysable, la décision de prélever à nouveau doit dépendre de l'indice de performance (PS), de l'accessibilité des lésions, des images radiologiques et de la capacité à faire une nouvelle biopsie rapidement.

Lors de la progression sous chimiothérapie, les altérations génomiques majeures ou récurrentes – qui reflètent le caractère *driver* – sont retrouvées de manière robuste à la première rechute, hors utilisation de thérapeutiques ciblées. La situation est complètement différente lors de la progression sous thérapeutique ciblée. En effet, la nécessité d'une nouvelle biopsie à la progression est justifiée par le fait que les tumeurs peuvent présenter une sélection de clones tumoraux sous la pression thérapeutique, avec des anomalies moléculaires diverses parfois ciblables, mais potentiellement différentes entre tumeur primitive et métastases. Le taux d'échec des rebiopsies varie de 4 à 25 %, et le taux de complications de moins de 1 à 16 % (43).

◆ **Biopsies liquides : ADN tumoral circulant du plasma, cellules tumorales circulantes**

L'ADN total libre circulant (*Cell-Free DNA* [cfDNA]) [ADNtc] proviendrait de manière "passive", à la suite de la mort des cellules présentes dans différents tissus, sains, inflammatoires ou cancéreux, par apoptose, nécrose ; ou de manière "active", par relargage actif à partir des cellules tumorales. La quantité de cfDNA est plus importante chez les malades atteints d'un cancer que chez des malades non atteints de cancer ou des sujets sains. L'ADNtc représente une fraction variable du cfDNA (< 0,01 % à > 90 %). Les concentrations d'ADNtc varient en fonction du stade de la maladie et seraient plus élevées dans les

stades avancés de CBNPC, avec une valeur de mauvais pronostic. Le challenge est de pouvoir distinguer l'ADN provenant des cellules normales de celui provenant des cellules tumorales. Pour cela, il faut à la fois respecter les recommandations relatives au préanalytique afin de limiter la contamination par de l'ADN normal des cellules du sang périphérique et utiliser des techniques de biologie moléculaire suffisamment sensibles, afin que l'analyse de l'ADNtc puisse être une aide au diagnostic et au suivi moléculaire avec un tel test non invasif facilement renouvelé. Plusieurs techniques sont actuellement disponibles pour la caractérisation moléculaire de l'ADNtc, comme la PCR spécifique d'allèle, la PCR enrichie, la PCR clampée, le HRM (*High Resolution Melting*), le pyroséquençage, le NGS ou la PCR digitale (cf. infra). Depuis 2007, plusieurs études ont rapporté des spécificités comprises entre 87 à 100 %, mais des sensibilités plus variables, allant de 36 à 100 % (44). La problématique reste celle des faux négatifs. La recherche d'une mutation dans l'ADNtc devrait donc pouvoir être proposée au diagnostic quand le prélèvement tissulaire n'est pas utilisable – bloc épuisé, prélèvement disponible mais pauvre en cellules tumorales, mauvaise qualité de l'ADN (os, fixation, etc.), prélèvement tissulaire non réalisable (prescription du géfitinib en première ligne, extension de l'AMM de l'EMA [Agence européenne des médicaments] en septembre 2014). Son utilité pour la caractérisation des mécanismes de progression sous thérapeutique ciblée est désormais établie, et la mise en évidence d'une mutation de résistance acquise T790M de l'EGFR dans l'ADN plasmatique est une indication de traitement par osimertinib. Un grand nombre d'anomalies moléculaires peut être recherché dans l'ADNtc (mutations, amplifications). Une des limitations de l'ADNtc est qu'il n'est pas possible d'utiliser la FISH et l'IHC, notamment pour détecter des anomalies telles que les translocations d'ALK, de ROS1 et de RET.

Les cellules tumorales circulantes (CTC) sont des cellules tumorales qui ont disséminé depuis la tumeur primitive ou les sites métastatiques, et qui circulent dans le sang périphérique. L'étape dite d'enrichissement se fonde sur la séparation des cellules tumorales et des cellules du sang sur la base de critères immunologiques – la technique CellSearch® basée sur la détection de marqueurs épithéliaux (anti-EpCAM ou anticytokeratines), technique semi-automatique reposant sur une séparation immunomagnétique, à partir de billes magnétiques porteuses de ces anticorps – ou morphologiques – la technique ISET® séparant par filtration les cellules bénignes des cellules malignes sur la base de critères morphologiques de taille. L'étape

**Tableau I.** Avantages et inconvénients de l'ADN tumoral circulant (ctDNA) par rapport aux cellules tumorales circulantes (CTC) en vue d'une analyse moléculaire.

Type d'analyse	Avantages	Inconvénients
ADN tumoral circulant	Sensibilité: 36-100 %	Respect des étapes préanalytiques
	Recherche des mutations à visée théranostique	Quantité faible
	Suivi moléculaire	Recherche des translocations par FISH Faux négatifs
Cellules tumorales circulantes	Visualisation directe d'un phénotype malin	Quantité très faible
	Analyse immunocytochimique	Fragilité des cellules
	Recherche des translocations par FISH	Sensibilité: 0-75 % Faux négatifs Hétérogénéité de la population
		Recherche des mutations

ultérieure, dite de détection, sert à mettre en évidence des biomarqueurs. La sensibilité de cette technologie est nettement inférieure à celle de l'ADNtc, du fait des nombreux faux négatifs. En fait, les CTC sont très hétérogènes, et c'est probablement une combinaison de techniques qui serait nécessaire. À côté de l'expression de gènes tumoraux par RT-PCR à partir des CTC, c'est la FISH qui paraît la plus intéressante pour la détection de translocations ou de variations du nombre de copies. Au total, les 2 approches (ADNtc et CTC) sont différentes et complémentaires ([tableau I](#)). La caractérisation moléculaire de l'ADNtc paraît plus facile à mettre en œuvre de manière décentralisée sous la condition du respect strict des étapes préanalytiques (cf. infra). L'utilisation des CTC en pratique de routine semble, dans l'immédiat, plus complexe à mettre en œuvre. Enfin, d'autres tests sont en cours d'évaluation, comme la détection des microARN circulants ou des exosomes.

### Précautions préanalytiques

Le temps d'ischémie, la nature du fixateur, la durée de fixation et le protocole d'inclusion en paraffine sont autant de paramètres pouvant jouer sur la qualité des ADN extraits, qui doivent être tracés par le pathologiste et être accessibles au biologiste moléculaire. Les biopsies sont à fixer immédiatement, et les pièces opératoires, dans l'heure, en privilégiant le formol tamponné à 10 % (proscrire le liquide de Bouin et les fixateurs contenant de l'acide picrique ou des dérivés mercuriels). La durée de fixation idéale est de 6 à 24 heures, pour les biopsies, et de 24 à 48 heures,

pour les pièces. La température de la paraffine doit rester inférieure à 60 °C. Pour décalcifier les prélèvements osseux, l'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA) à 10 % ou un acide doux, comme l'acide formique, doit être privilégié. Tous les échantillons inclus en paraffine (FFPE [*Formalin-Fixed Paraffin Embedded*]) peuvent être utilisés pour le génotypage, même si le *gold standard* reste le tissu congelé ou le tissu frais. Le formol induit une fragmentation de l'ADN, avec des fragments inférieurs à 300 pb rendant nécessaire de n'amplifier que des fragments courts nécessaires de n'amplifier que des fragments courts nécessaires de n'amplifier que des fragments courts nécessaires. Il pourrait entraîner des inversions de bases qui, en conditions limites de concentration d'ADN, pourraient générer des faux positifs. L'utilisation d'échantillons FFPE est plus problématique pour la recherche de translocations d'ALK ou de ROS1 par RT-PCR à partir d'ARN extrait d'échantillons inclus en paraffine, et n'est actuellement pas recommandée en routine.

Si l'échantillon tumoral ne répond pas aux critères de qualité requis pour le génotypage, on parlera de prélèvement sous-optimal. En effet, il est important de prendre en compte ces critères pour l'interprétation des résultats du génotypage (risque de faux négatifs, faux positifs). Aucun génotypage ne devrait être effectué sans connaissance de la cellularité tumorale de l'échantillon analysé. En effet, ce pourcentage doit être systématiquement confronté au seuil de sensibilité des techniques moléculaires utilisées. L'enrichissement en cellules tumorales peut être proposé par des techniques de macro- ou de microdissection. Chaque plateforme de génotypage doit donc déterminer le seuil de cellules tumorales minimal nécessaire en fonction

de ses techniques. À côté de la cellularité tumorale, l'amplification de gènes peut également influencer les résultats de biologie moléculaire, aussi bien en matière d'hétérogénéité intratumorale que de sensibilité des analyses (45). Le développement de certaines techniques de NGS permet d'obtenir ces informations parallèlement. Le seuil de sensibilité d'un test moléculaire peut être défini comme la plus faible concentration de cellules tumorales dans laquelle la mutation est encore détectée avec une reproductibilité de 100 % à la fois en *intra-run* comme en *inter-run*. La limite de sensibilité d'un test moléculaire peut aussi être définie à partir d'une population de cellules mutées connue en provenance d'une culture cellulaire et diluée avec des cellules non mutées, ou de l'ADN muté dilué avec de l'ADN non muté. Les résultats négatifs sont alors considérés comme sauvages (*wild type*).

#### ◆ *Technique d'extraction de l'ADN*

Il s'agit de la première étape pour la réalisation de l'analyse moléculaire ; elle fait partie des étapes préanalytiques après la fixation et la sélection du prélèvement à analyser. Son objectif est d'obtenir des acides nucléiques en quantité suffisante pour permettre la réalisation des tests moléculaires. Dans le cas de prélèvements inclus en paraffine, elle dure à peu près 5 heures et comporte 3 étapes. La première, indispensable lorsque les tissus sont inclus en paraffine, est le déparaffinage, qui se fait par chauffage ou par l'utilisation de solvants (si on dispose de tissus congelés, cette étape n'est pas effectuée). Cette étape est suivie d'une lyse par la protéinase K qui va permettre la digestion de toutes les structures cellulaires. La dernière étape est l'extraction des acides nucléiques proprement dite, sur colonne d'affinité avec de nombreux kits commerciaux de qualité comparable pouvant être automatisés. La technique par précipitation n'est plus pratiquée. L'utilisation de certains solvants, comme le xylène, peut gêner l'amplification ultérieure (46). La quantification et la qualification de l'ADN ainsi extrait terminent la partie préanalytique (47). La quantification peut s'effectuer par spectrophotométrie au NanoDrop® avant la réalisation d'un séquençage de Sanger ou de techniques ciblées, ou par fluorométrie au Qubit® avant la réalisation d'un NGS. Elle permet d'évaluer la quantité d'ADN extrait et sa pureté, mais pas le rendement d'amplification.

#### ◆ *Recherche de mutations dans l'ADNtc*

Les recommandations actuelles sont d'effectuer le prélèvement sanguin sur tube EDTA (de quoi obtenir

au moins 4 ml de plasma, soit 2 tubes EDTA de 5 ml) et de réaliser 2 centrifugations successives en évitant de prélever des cellules à l'interface culot/plasma. Le plasma peut alors être congelé avant extraction de l'ADN. Le délai entre la réalisation du prélèvement et la première centrifugation doit être de moins de 4 heures, ce qui est assez contraignant en pratique. L'alternative est d'utiliser des tubes permettant la conservation et la stabilisation de l'échantillon, qui peuvent se conserver plus de 24 heures à température ambiante avant centrifugation. La technique d'extraction de l'ADN actuellement retenue est l'utilisation d'un kit spécifique.

## Évaluation des biomarqueurs par techniques de biologie moléculaire

Les plateformes de génotypage doivent utiliser des techniques de biologie moléculaire qui soient validées et suffisamment performantes, et adapter les techniques utilisées à la cellularité tumorale des prélèvements à analyser (48). En revanche, l'augmentation de la sensibilité des techniques de biologie moléculaire permettra la mise en évidence de sous-clones mutés dont la valeur pronostique et prédictive n'est pas toujours démontrée. L'IHC n'est actuellement pas recommandée pour la sélection des patients atteints d'un cancer à EGFR muté pouvant bénéficier d'un traitement par ITK de l'EGFR. La détection du nombre de copies de l'EGFR n'est pas non plus utile à la sélection des patients, quelle que soit la technique utilisée.

Les techniques de biologie moléculaire pour la recherche de mutations sont basées sur la réaction de PCR, qui consiste en une photocopie de l'ADN en des milliers d'exemplaires. À chaque cycle, la quantité d'ADN va doubler, augmentant ainsi de manière exponentielle au fur et à mesure des cycles. Les techniques utilisées comprennent historiquement le séquençage de Sanger, puis les techniques alternatives – HRM, pyroséquençage, PCR en temps réel, analyse de fragment, SNaPshot® – et, maintenant, la PCR digitale et le NGS.

### Séquençage de Sanger

Le séquençage de Sanger est la méthode historique de référence et correspond à une détermination bidirectionnelle de la séquence via l'utilisation de didéoxy-

terminateurs fluorescents. Cette technique est capable de détecter précisément une séquence mutée quand elle représente 25 % de l'ADN total, ce qui correspond à une cellularité tumorale d'au moins 50 % pour une mutation hétérozygote, sans polysomie ou amplification du gène considéré. Cette méthode est la technique qui a été initialement utilisée pour la mise en évidence des mutations de l'EGFR comme marqueur prédictif d'efficacité des ITK de l'EGFR. Néanmoins, si cette technique est exhaustive pour la détection d'une mutation dans une séquence donnée, elle est longue à réaliser et ne peut être appliquée à tous les échantillons, notamment en cas de cellularité tumorale faible, comme c'est fréquemment le cas pour les biopsies bronchiques. La sensibilité de cette technique peut être améliorée par la PCR clampée. Cette technique inclut dans la réaction de PCR un petit peptide "PNA" (*Peptide Nucleic Acid*) qui, se fixant sur la séquence sauvage, favorisera l'amplification de la séquence mutée, permettant de descendre à une sensibilité de 10 %.

### Techniques moléculaires alternatives

Elles sont plus rapides et de sensibilité variable mais touchent moins de 10 % des cellules mutées (1). Elles permettent soit une détection sans a priori ou non ciblée de l'ensemble des mutations d'un exon donné (HRM, pyroséquençage, analyse de fragment), soit une détection ciblée des mutations les plus fréquentes par PCR en temps réel ou par SNaPshot®.

#### ◆ *Technique HRM*

Basée sur le profil de courbes de fusion d'un produit d'amplification contenant un fluorochrome intercalant, elle se fait en 7 étapes, ce qui peut augmenter le risque de contamination. L'HRM permet d'identifier la présence d'un mutant, quel qu'il soit, au sein d'un produit d'amplification, mais ne permet pas d'identifier la mutation sans effectuer un séquençage dans un deuxième temps, ce qui pourra poser des problèmes d'interprétation en raison des sensibilités différentes de ces 2 techniques. Des polymorphismes peuvent modifier l'aspect des courbes en HRM.

#### ◆ *Pyroséquençage*

Il s'agit d'un séquençage court autour des régions d'intérêt nécessitant une étape d'amplification préalable pouvant être réalisée en multiplex. Une bonne sensibilité et la possibilité d'analyser de petits fragments de PCR fait que cette méthode est bien adaptée aux échantillons fixés en paraffine.

#### ◆ *Analyse de fragment*

Il s'agit d'amplifier une petite séquence d'environ 100 pb autour du locus potentiellement délété ou inséré à l'aide d'une amorce marquée par un fluorophore. La présence d'une mutation sera identifiée par l'amplification d'un fragment plus petit s'il y a une délétion, ou plus grand dans le cas d'une insertion, par comparaison avec un témoin non muté. La taille de la délétion ou de l'insertion pourra être définie en nombre d'acides aminés perdus ou gagnés, mais l'anomalie ne pourra pas être identifiée exactement.

#### ◆ *PCR en temps réel*

C'est une technique en 1 étape utilisant différents types de sondes, spécifiques d'une mutation donnée (sonde TaqMan®, sonde d'hybridation, etc.). Il faut donc utiliser autant de sondes qu'il y a de mutations à rechercher. La sensibilité de ces techniques est inférieure à 10 %, mais peut elle aussi être ramenée à 1 % grâce à l'utilisation de PCR clampée par l'introduction, dans la réaction, de PCR de PNA.

#### ◆ *SNaPshot®*

C'est une technique d'extension d'amorces qui permet l'identification en multiplex des variants de plusieurs loci en même temps. Cette technique a le désavantage de comporter plusieurs étapes en postamplification, ce qui augmente le temps de réalisation du test et le risque de contamination. Mais la sensibilité est meilleure que celle obtenue par séquençage. En revanche, elle n'est pas adaptée à la détection des délétions ou des insertions.

### PCR digitale

Les techniques de PCR digitale sont fondées sur le principe d'une amplification par PCR de fragments uniques d'ADN dans des microcompartiments. Ces microcompartiments peuvent être des puits de microplaques, des compartiments microfluidiques ou des microgouttelettes lipidiques (ddPCR [*Droplet Digital PCR*]). Elles permettent aujourd'hui de disposer de technologies de très haute sensibilité, qui rendent possible la détection d'une séquence mutée au sein de 10 000 à 100 000 (voire 1 million) séquences sauvages, soit une sensibilité de 0,01, voire 0,001 % (à 0,000 1 %). La sensibilité de la PCR digitale dépend du nombre de compartiments (et donc de molécules uniques) analysés. La PCR digitale est donc à la fois très sensible et quantitative. La PCR digitale par BEAMing (PCR en émulsion sur billes magnétiques et analyse par cytométrie en flux)



**Tableau II.** Les différentes méthodes de biologie moléculaire.

Méthodes	Types de variants détectés	Avantages	Inconvénients	Sensibilité
<b>Non ciblées</b>				
Séquençage par la méthode Sanger	Mutations	Exhaustive	Durée de la technique Sensibilité	> 20 %
HRM	Mutations	Exhaustive	Nombreuses étapes Sensibilité Non-confirmation	5-10 %
Pyroséquençage	Mutations CNV	Multiplex		10 %
NGS "ciblé" classique	Mutations CNV Translocations	Choix du panel	Sensibilité Coût	1-2 %
<b>Ciblées</b>				
Analyse de fragment	Mutations (délétions, insertions)	Rapide	Ne détecte pas les substitutions Sensibilité	< 10 %
PCR en temps réel	Mutations	Rapide	Ciblée Coût	1-10 %
SNaPshot®	Mutations	Rapide	Nombreuses étapes	5 %
PCR digitale	Mutations CNV Translocations	Rapide	Ciblée Capacité de multiplexage limitée	< 0,01 %

CNV: variation du nombre de copies; HRM: High-Resolution Melting.

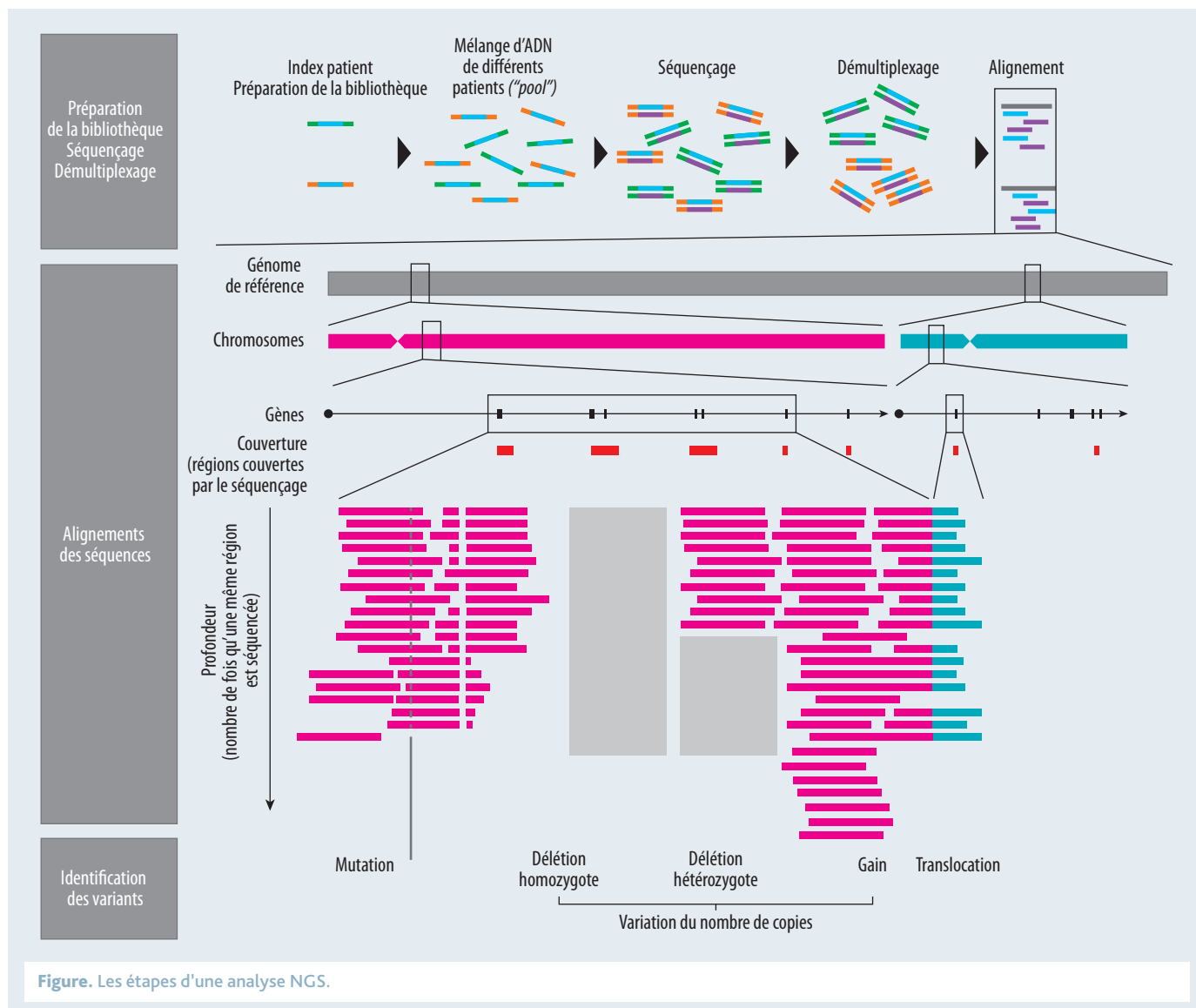
montre une sensibilité théorique de 1 séquence mutante pour 10 000 séquences sauvages. Il s'agit d'une procédure quantitative mais relativement complexe à mettre en œuvre. La PCR digitale en émulsion (ou *Droplet Digital PCR* [ddPCR]), montre une sensibilité théorique de 1 séquence mutante pour 20 000 séquences sauvages (pour chaque puits analysé). Il s'agit d'une technologie éprouvée, combinant émulsion et microfluidique, qui permet, pour chaque échantillon, la génération de 20 000 gouttelettes uniformes d'un volume d'un nanolitre, dans lesquelles les molécules d'acides nucléiques à analyser sont distribuées de façon aléatoire (distribution selon la loi de Poisson). Chaque microgouttelette se comporte comme un compartiment d'amplification indépendant, ce qui permet l'analyse individuelle de chaque molécule d'ADN amplifiée. Le niveau de sensibilité atteint est donc très largement supérieur à celui des PCR conventionnelles, où l'analyse se fait en masse sur l'ensemble des produits d'amplification. Des progrès récents en ddPCR montrent la faisabilité de PCR multiplex permettant la quantification de plus de 5 cibles par gouttelette dans une seule amplification (49). Il s'agit d'un système versatile, utilisant comme chimie de détection soit des agents intercalants fluorescents, soit des sondes d'hydrolyse de type TaqMan®,

avec la possibilité de disposer d'amorces et de tests prévalidés en laboratoire par Bio-Rad, et donc directement utilisables en routine. Cette technologie est applicable à l'analyse de l'ADN tumoral, mais également à l'ADN extrait de biopsies liquides (ADNtc), car capable de détecter des altérations génomiques à partir d'une quantité de matériel très faible.

Si l'on compare la sensibilité du NGS et de la PCR digitale, la ddPCR est significativement la plus sensible (< 0,01 %), la sensibilité du NGS allant de plus de 10 %, pour le séquençage d'exomes, à moins de 0,1 %, pour les méthodes optimisées (Tam-Seq, Safe-Seq, etc.), en passant par 1 à 5 % pour le NGS ciblé classique. En revanche, la capacité de multiplexage est de 5 à 10 cibles au maximum pour la PCR digitale, alors que l'on peut analyser plus de 100 amplicons en NGS ciblé classique. Le NGS permet l'analyse du génome tumoral et de ses évolutions sans a priori, alors que la PCR digitale analyse un ou plusieurs marqueurs connus (*tableau II*).

### Séquençage de nouvelle génération (NGS)

À l'ère de la médecine personnalisée et de la multiplication des biomarqueurs théranostiques, l'analyse séquentielle des altérations moléculaires n'est plus



optimale, en particulier pour des raisons de délai de réponse, de nombre de cibles à séquencer et d'épuisement du matériel de biopsie. En 2017, l'ensemble des 28 plateformes de génétique moléculaire des cancers labélisées par l'INCa ont mis en place des méthodes de NGS pour la détection de mutations somatiques. L'analyse par NGS via un panel ciblé de gènes permet la détermination en une seule analyse d'altérations de gènes dits actionnables qui sont des cibles moléculaires validées pour des thérapies ciblées. L'INCa a ainsi publié, en février 2016, une liste minimale consensuelle de gènes à analyser dans le cadre d'un usage à visée diagnostique du NGS, dans laquelle sont notamment retrouvées des régions des gènes EGFR, ERBB2, ALK, MET, BRAF et KRAS (50). L'utilisation de panels commerciaux inspirés de ce

panel minimal permet ainsi d'analyser rapidement quelques centaines de *hot spots* mutationnels sur plusieurs échantillons simultanément (multiplexage) pour un coût modéré.

Le NGS est un processus complexe et multiétapes qui peut être réalisé à partir d'ADN extrait du matériel de biopsie FFPE. La première étape consiste à générer une "bibliothèque" de fragments en sélectionnant les régions d'intérêt par amplification PCR (stratégie par amplicon) ou par hybridation à des sondes (stratégie par capture). Lors de cette étape, des séquences nucléotidiques spécifiques pour chaque échantillon analysé sont ajoutées aux extrémités des fragments générés. Ces index moléculaires servent ainsi de "codes-barres" spécifiques permettant l'analyse simultanée de plusieurs

### Références bibliographiques

1. Barlesi F, Mazieres J, Merlio JP et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic InterGroup (IFCT). *Lancet* 2016;387:1415-26.
2. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol* 2013;8:823-59.
3. Paez JG, Jänne PA, Lee JC et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-500.
4. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 2010;362:2380-8.
5. Park K, Tan EH, O'Byrne K et al. Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2016;17:577-89.
6. Jänne PA, Yang JCH, Kim DW et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015;372:1689-99.

 Retrouvez l'intégralité des références bibliographiques sur [www.edimark.fr](http://www.edimark.fr)

M. Beau-Faller déclare ne pas avoir de liens d'intérêts.

Les autres auteurs n'ont pas précisé leurs éventuels liens d'intérêts.

échantillons dans un seul *run* de séquençage (multiplexage). Après amplification et purification des produits de la bibliothèque, le séquençage est réalisé sur un séquenceur de nouvelle génération. Les données de séquençage brutes sont ensuite analysées au moyen d'outils bio-informatiques qui permettent l'alignement des séquences sur le génome humain de référence et la détection des variants (figure, p.17). Ces résultats sont interprétés par un biologiste moléculaire, qui établit un compte rendu résumant l'ensemble des analyses en hiérarchisant l'information en 2 parties :

- les mutations ou variants dont les conséquences théranostiques sont validées ;
- les mutations ou variants sans effet théranostique connu, mais avec un potentiel effet activateur ou délétère et dont l'interprétation clinique sera discutée en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) moléculaire (1).

Face à ce processus complexe et multiétapes, les résultats peuvent être validés en prenant en compte les données préanalytiques, en étudiant les risques d'erreur lors de l'analyse et en mettant en place des contrôles de qualité interne et nationaux. Concernant les données préanalytiques, la quantification et la qualification des échantillons d'ADN sont une étape importante. Elles peuvent être réalisées, respectivement, par fluorimétrie et par PCR quantitative. Les résultats de dosage et de qualification seront utilisés dans l'interprétation des résultats avec les données de la cellularité tumorale, qui est déterminée par un anatomopathologiste à partir d'une coupe du matériel FFPE (51).

La sensibilité de détection des variants par la technique NGS est généralement de l'ordre de 5 %, mais elle peut descendre jusqu'à 1 à 2 % à condition que la profondeur de séquençage soit suffisante. Cette sensibilité soulève un challenge d'interprétation clinique lié aux sous-populations clonales. En effet, il n'existe à l'heure actuelle aucun consensus quant à la valeur pronostique ou prédictive des sous-populations clonales mutées ainsi identifiées par rapport à l'utilisation des thérapies ciblées.

En complément de la recherche de mutations ponctuelles, les recommandations actuelles pour la recherche des translocations d'ALK et de ROS1 reposent sur une présélection par IHC avec confirmation par FISH. Néanmoins, la technique NGS peut également permettre d'identifier les translocations. Cette application n'est pas encore largement déployée en routine, mais cette approche pourrait être plus sensible que la FISH et permettrait de détecter simultanément l'ensemble des fusions d'intérêt clinique (ALK, ROS1, RET, NTRK) avec une économie de matériel tissulaire tumoral. Pour soutenir cette évolution future dans le cadre du soin, l'INCa a mis en place, en 2017, un programme de criblage (AcSé moléculaire 2) visant à valider, développer et mettre en place la recherche des différents transcrits de fusion d'ALK et de ROS1 par NGS à partir d'ARN extrait de tissus fixés et inclus en paraffine.

Parallèlement à ces techniques NGS reposant sur l'analyse de panels de gènes, se développent des applications d'exploration plus complète soit de l'exome, soit du génome. Ces approches permettent la découverte de nouvelles altérations génomiques, mais il reste à établir leur place dans la stratégie d'analyse des tumeurs en routine (52). L'enjeu de l'analyse de l'exome, actuellement en cours de développement pour une application diagnostique, sera d'interpréter non pas la présence d'une altération isolée, mais celle d'un réseau de variants associés.

### Conclusion

En un peu plus d'une décennie, la prise en charge des malades atteints d'un cancer bronchique a profondément changé, imposant aux cliniciens de nouvelles connaissances et de nouvelles pratiques. Pour continuer à améliorer le bénéfice ainsi apporté à ces patients, l'organisation de l'évaluation de ces biomarqueurs évolue avec le plan Médecine France génomique 2025 : de quoi maintenir une avance certaine pour la France dans ce domaine. ■

### AVIS AUX LECTEURS

Les revues Edimark sont publiées en toute indépendance et sous l'unique et entière responsabilité du directeur de la publication et du rédacteur en chef. Le comité de rédaction est composé d'une dizaine de praticiens (chercheurs, hospitaliers, universitaires et libéraux), installés partout en France, qui représentent, dans leur diversité (lieu et mode d'exercice, domaine de prédilection, âge, etc.), la pluralité de la discipline. L'équipe se réunit 2 ou 3 fois par an pour débattre des sujets et des auteurs à publier.

La qualité des textes est garantie par la sollicitation systématique d'une relecture scientifique en double aveugle, l'implication d'un service de rédaction/révision in situ et la validation des épreuves par les auteurs et les rédacteurs en chef.

Notre publication répond aux critères d'exigence de la presse :

- accréditation par la CPPAP (Commission paritaire des publications et agences de presse) réservée aux revues sur abonnements,
- adhésion au SPEPS (Syndicat de la presse et de l'édition des professions de santé),
- indexation dans la base de données internationale ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors),
- déclaration publique de liens d'intérêts demandée à nos auteurs,
- identification claire et transparente des espaces publicitaires et des publi-rédactionnels en marge des articles scientifiques.