

BIO MED 2024

LES JOURNÉES POUR L'AVENIR DE LA BIOLOGIE MÉDICALE

JEUDI 23 &
VENDREDI 24
MAI 2024

L'ADN tumoral circulant : bientôt en pratique courante ?

Dr Pierre Filhine-Trésarrieu – Laboratoire B2A
23 mai 2024

Bientôt en pratique courante ?

Actuellement réalisé par la majorité des laboratoires d'oncogénétique

Déjà incluse dans les référentiels, exemple du cancer bronchique non à petites cellules :

•« Si le prélèvement tissulaire est insuffisant ou si l'ADN est non amplifiable, une recherche de mutations est recommandée sur l'ADN tumoral circulant. » (référentiel Oncologik, CBNPC)

« La fin de CA 15-3 pour le monitoring du cancer, remplacé par un suivi de mutation dans l'ADNtc de mutation *PIK3CA* »

Non, (un peu de ?) patience...

Historique

1948 : ADN
plasmatique

1977 :
[cfDNA]pat >
[cfDNA]ctl

1994 :
Détection
mutation
KRAS
plasmatique

2016 : Cobas
EGFR
Mutation Test
v2 (FDA)

Quelques définitions

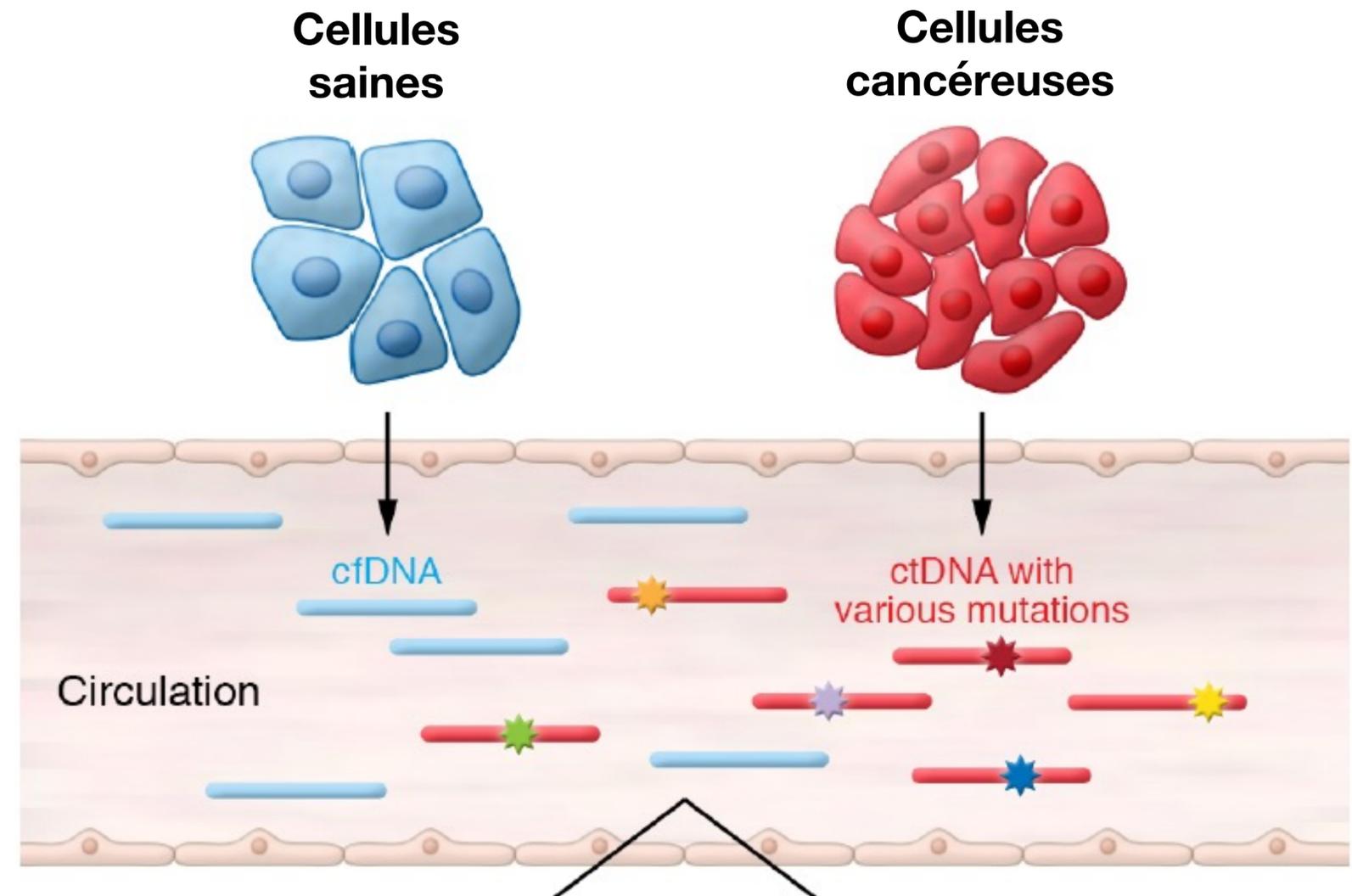
ADN libre circulant (cfDNA ou ADNlc) : ADN **libre**, en **faible quantité**, circulant dans divers **fluides biologiques**

ADN tumoral circulant (ctDNA ou ADNtc) : partie de l'ADN libre circulant, **en (plus) faible quantité**, dérivant des cellules tumorales, circulant dans divers fluides biologiques.

0.1% < VAFs < 10%, parfois supérieures

Biopsie liquide : ensemble d'examens permettant d'améliorer le diagnostic/dépistage/suivi de diverses pathologies :

- Aneuploïdies fœtales, RhD...
- Rejet de greffe
- **Cancérologie**



ADN libre circulant – caractéristiques

Composition : molécule d'ADN double brin, non liés à des protéines

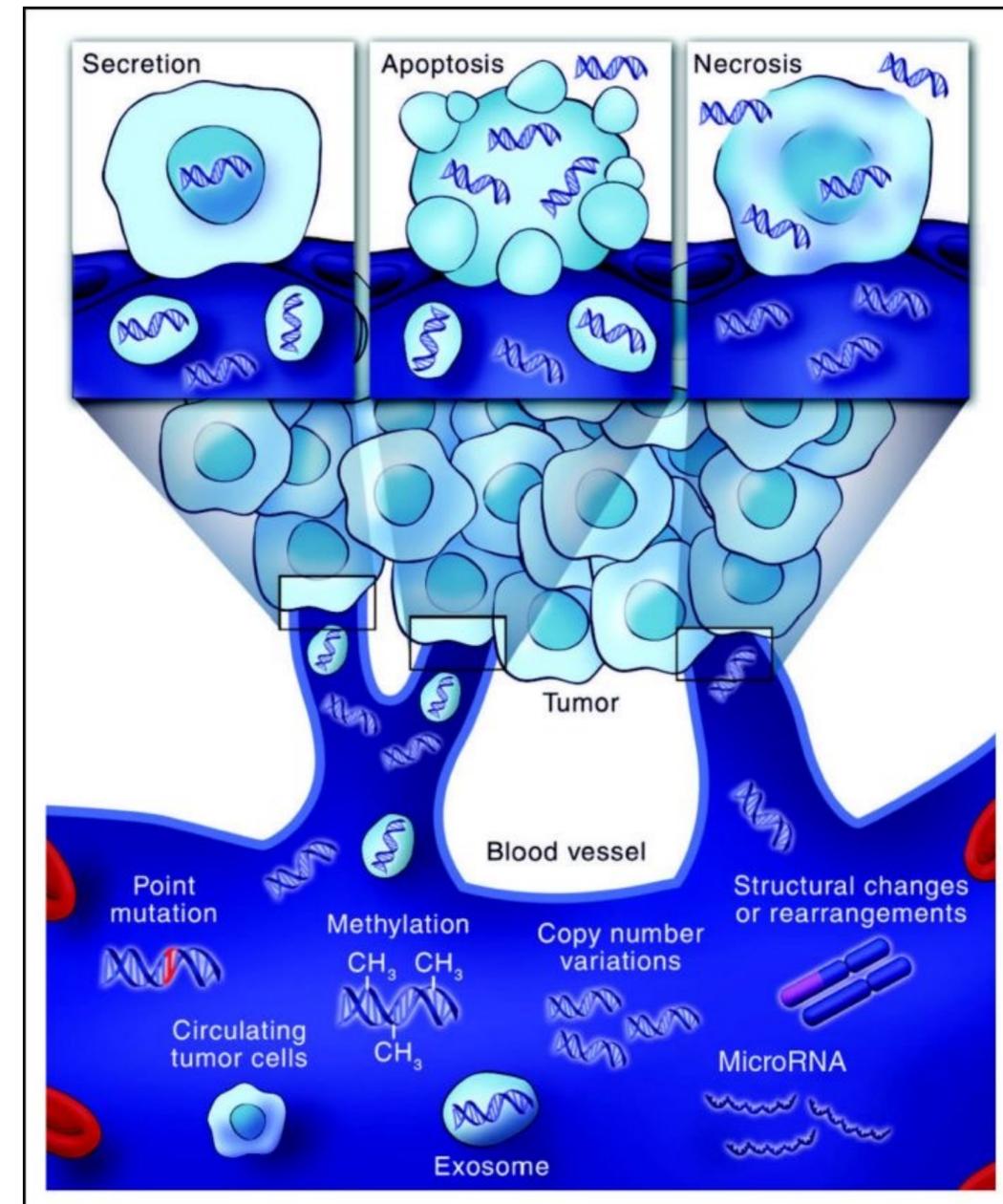
Taille : fragments de **166 pb**, rarement jusqu'à 10 000 pb

Mécanisme de libération

- **Apoptose** (166 pb)
- Nécrose
- Sécrétion par cellules tumorales

Élimination par **DNAse**, reins, foie et rate

Demi-vie courte : 15 min à quelques heures



Intérêt de la biopsie liquide

Cancer : **deuxième** cause de mortalité dans le monde

Biopsie : d'intérêt pour optimiser la prise en charge du patient

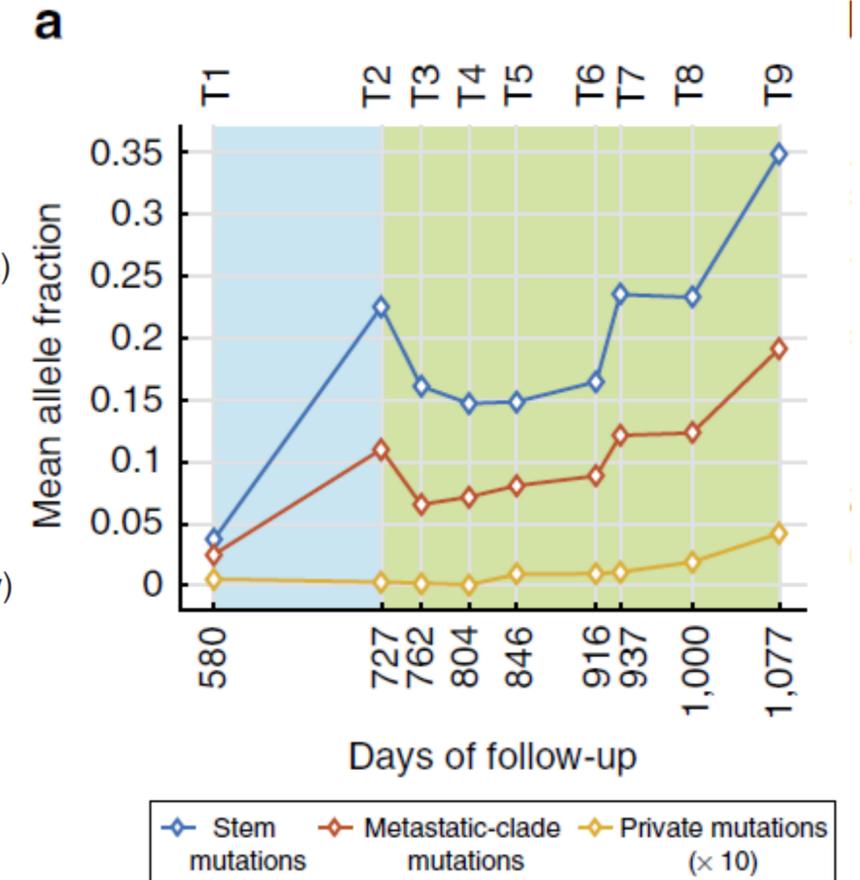
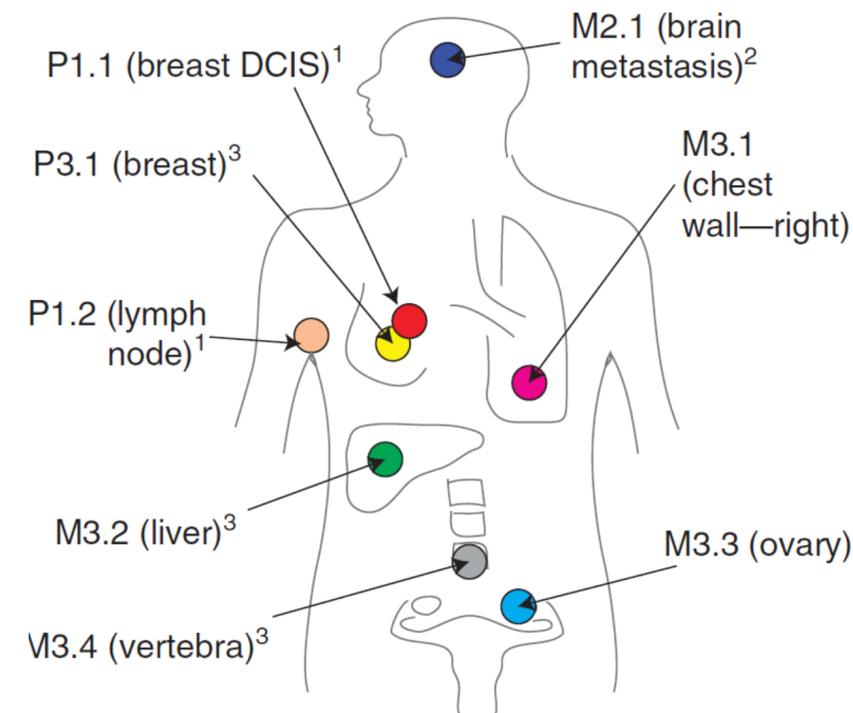
- Anatomopathologie
- Biologie moléculaire

Gold-standard mais imparfait :

- **Procédure invasive** et risques pour le patient (plateau technique lourd)
- **Quantité insuffisante** pour réalisation des analyses (25% dans les cancers pulmonaires) – épuisement des blocs
- **Hétérogénéité tumorale** (intra et entre primaire/métastase)
- Technique (cross-links de l'ADN par fixation, etc.)
- Evolution tumorale durant la thérapie

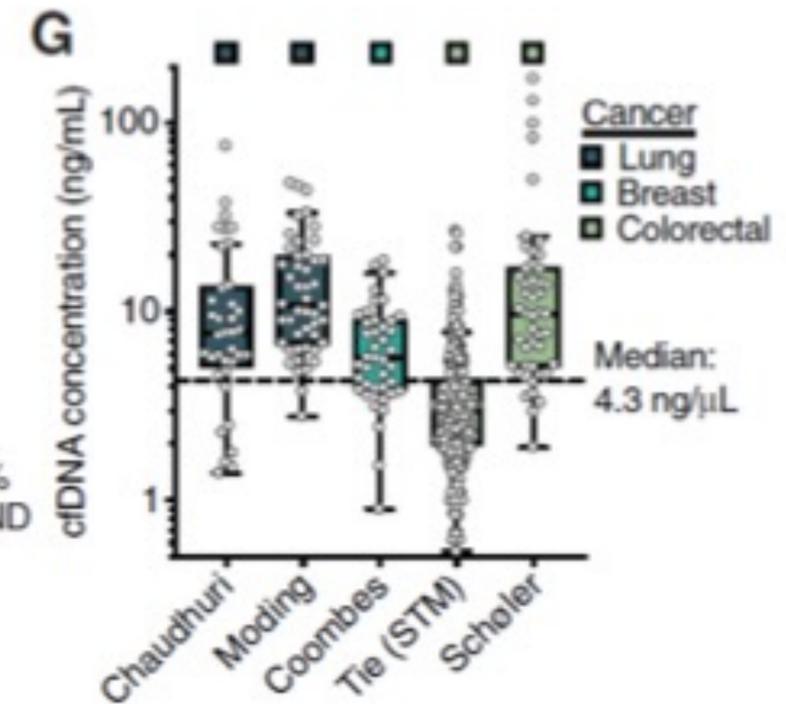
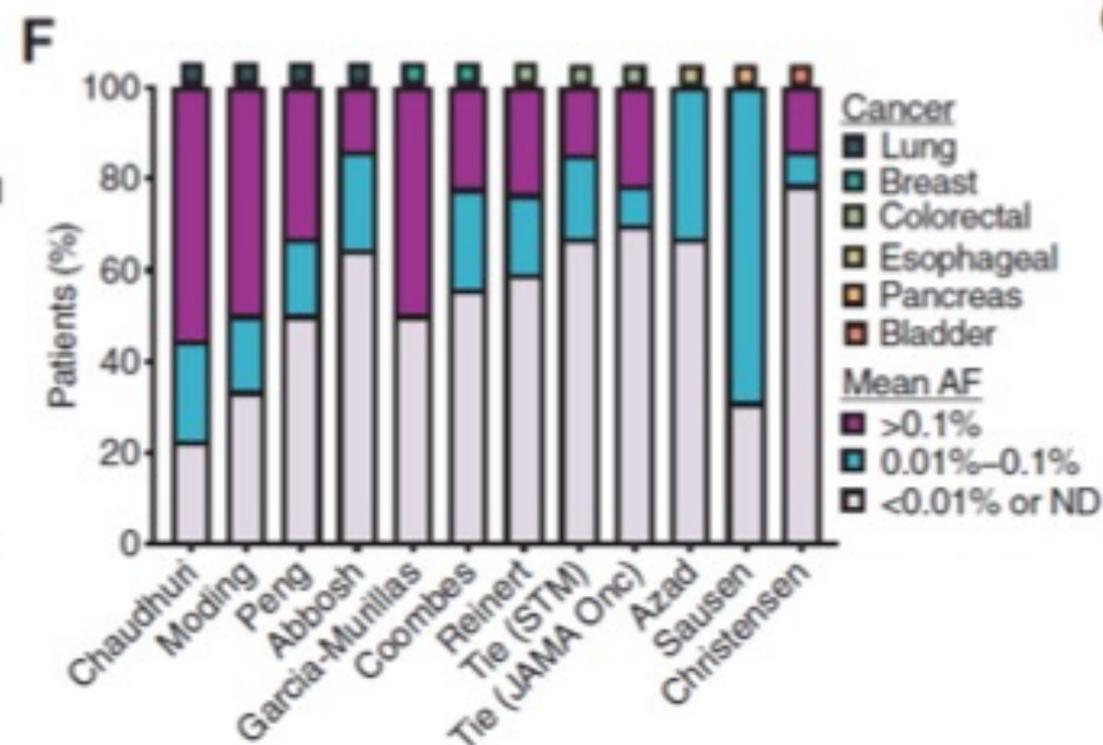
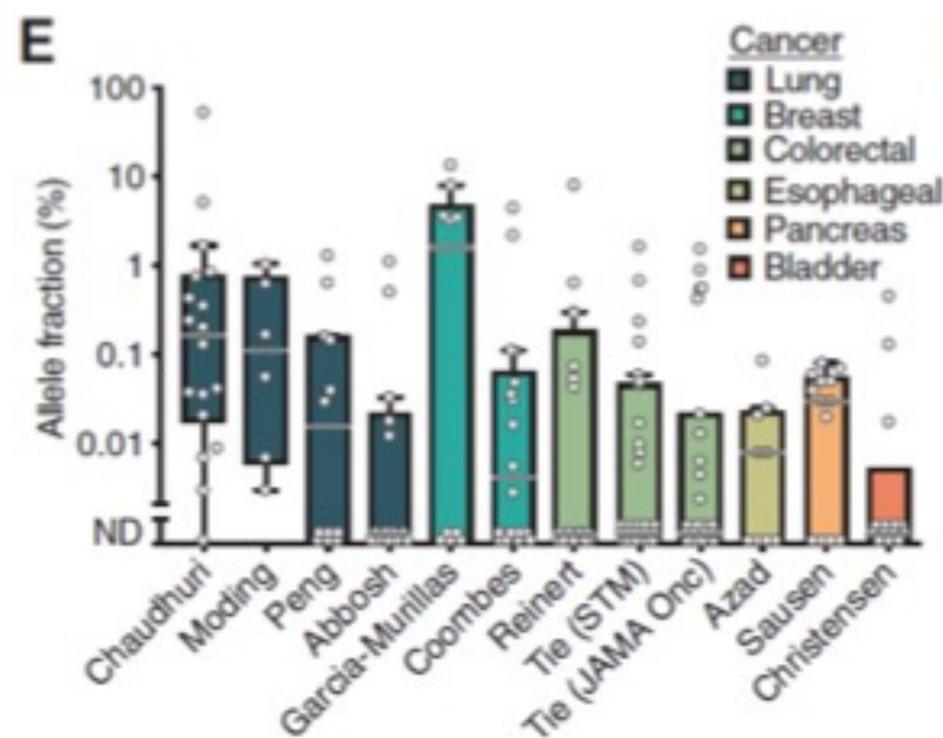
Biopsie liquide :

- Recueil **simple, non-invasif**, risque très faible
- Répétable
- « Rapide »
- ADN « frais »



Biopsie du tissu = *snapshot* vs. Biopsie liquide = *screenshot*

Limites de la biopsie liquide



Demi-vie courte : standardisation difficile de la phase préanalytique

Petites tailles (166 pb et pic à 144 pb) : méthodes d'extractions avec capacités de purification des fragments différentes

En faible quantité dans le sang :

- nécessité de développer des techniques **sensibles**
- contamination possible lors de l'analyse

Diaz LA Jr, Bardelli A. J Clin Oncol. 2014 PMID: 24449238

Moding EJ et al. Cancer Discov. 2021 PMID: 34785539

Dang DK, Park BH. J Clin Invest. 2022 Jun 15;132. PMID: 35703177

Préanalytique

Sérum vs plasma ?

- Sérum : plus grande quantité de ADNlc mais... dilution ADNtc dans une plus grande quantité de ADNlc issu de cellules saines

- Plasma :

- EDTA K2 vs Héparine : EDTA K2 (interférence par l'héparine)

- ½ courte (DNAse) : traitement rapide (1-2h) !

- Dilution par lyse des cellules saines (relargage cfDNA)

- **Tube STRECK :**

- Protège de la **lyse cellulaire**, de la **dégradation des ADNlc** : délai préanalytique toléré plus long

- **Double centrifugation** (diminution de la contamination par leucocytes résiduels)



Quasi standardisée, mais...

Franczak C et al. Expert Rev Mol Diagn. 2019 PMID: 30648442.
Dang DK, Park BH. J Clin Invest. 2022. PMID: 35703177
Donaldson J, Park BH. Annu Rev Med. 2018. PMID: 28846488.

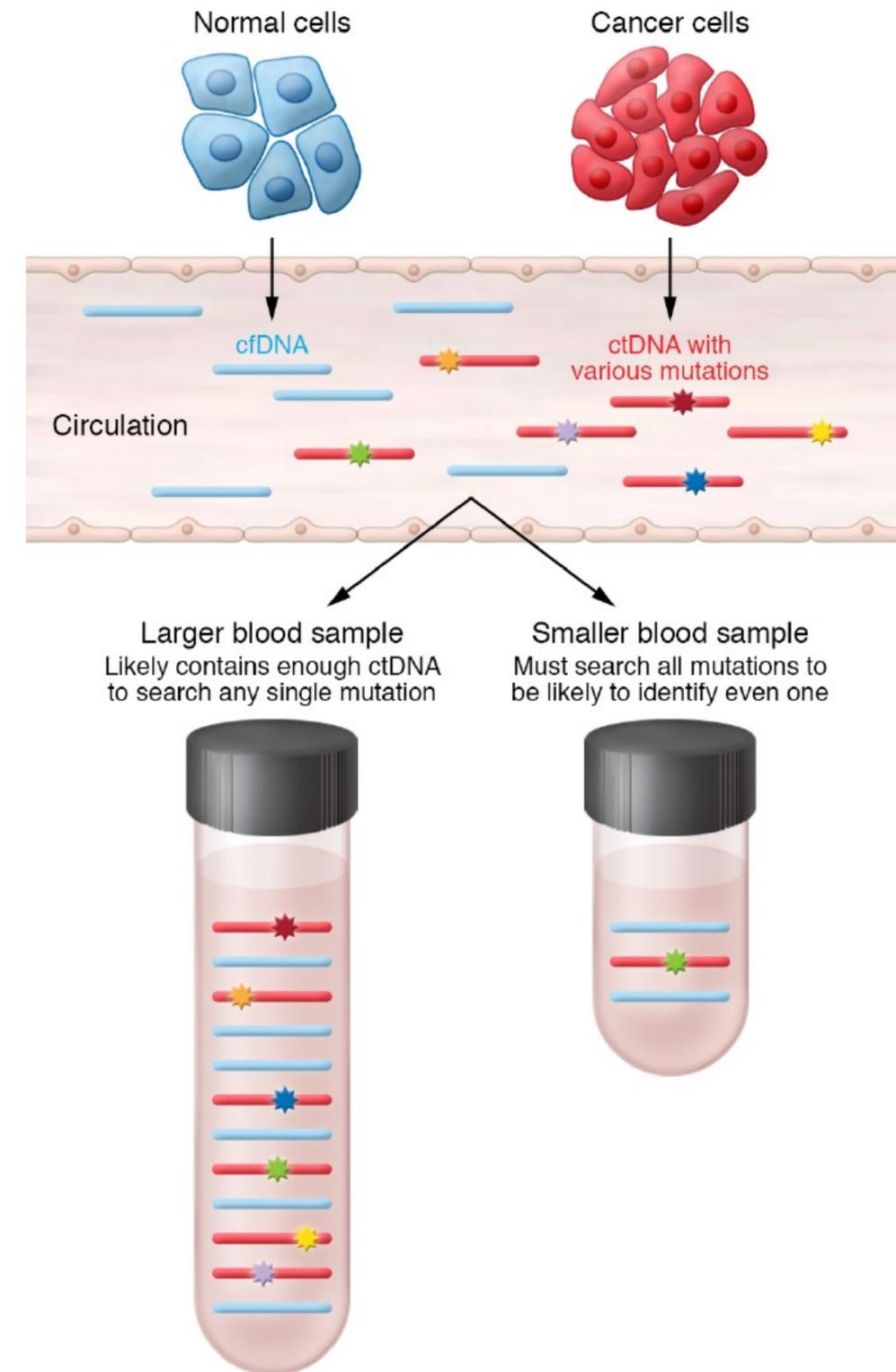
Préanalytique

Quel volume prélevé ?

- Plus grand volume prélevé => plus grande quantité d'ADN extrait
 - Nécessité d'une grande quantité d'ADN extrait pour améliorer la sensibilité
 - 10 000 molécules d'ADN pour une LoD de 0,01% soit 30 ng d'ADNlc
- Généralement : **20 mL de sang total**

Quand prélever ?

- **Inflammation post-intervention chirurgicale :**
 - augmentation de ADNc, notamment de cellules saines
- Jusqu'à 4 semaines

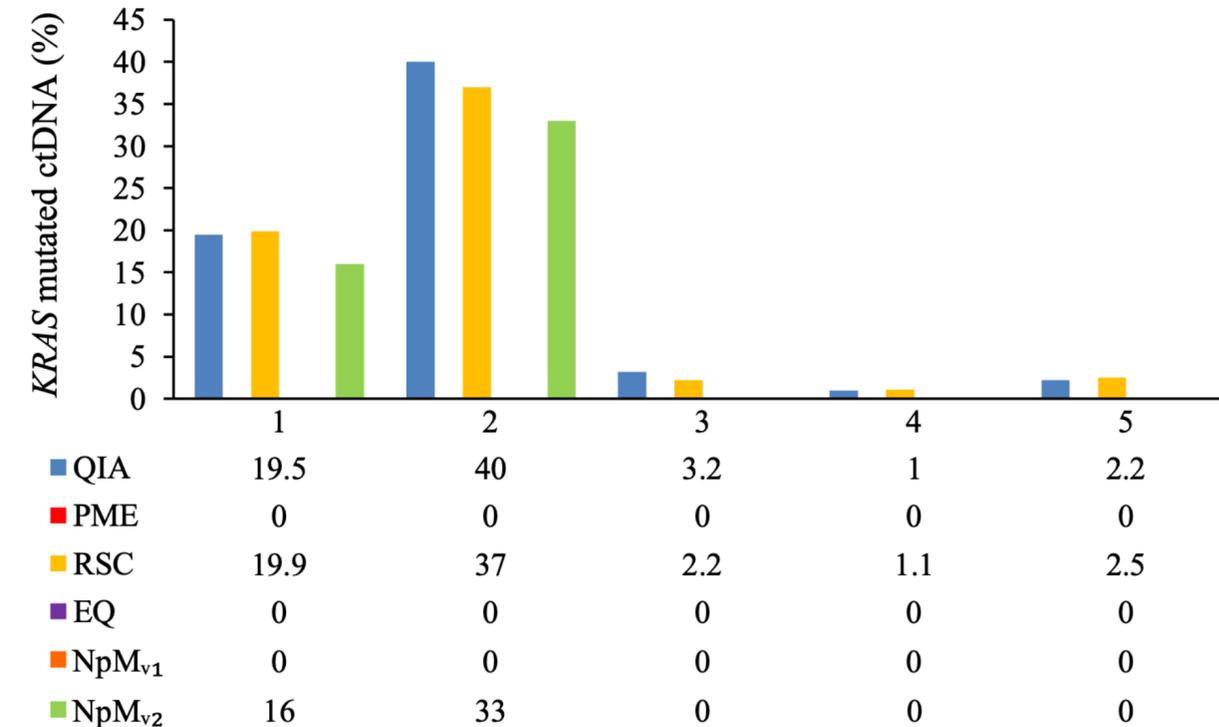


Extraction

Nombreux kits commerciaux et techniques existent

- Colonnes d'affinité, billes magnétiques...
- **Différences de performances** pour purifier les fragments de tailles différentes
- **Influence sur la quantité d'ADNlc extrait et la fraction d'ADNtc**
- Influence sur les techniques **utilisées ensuite** (inhibiteurs)

B



ID no.	Group	KRAS mutational status	
		Blood	Tissue
1	Stage IV PDAC	Mutated	NA
2	Stage IV PDAC	Mutated	NA
3	Stage IV PDAC	Mutated	NA
4	Stage IV PDAC	Mutated	NA
5	Stage IV PDAC	Mutated	NA

Sorber L et al. J Mol Diagn. 2017. PMID: 27865784.

Donaldson J, Park BH. Annu Rev Med. 2018. PMID: 28846488.

Analytique

En faible quantité dans le sang :

- $0.1 < \text{VAF} < 10\%$, **médiane quelques pourcents**
- nécessité de développer des **techniques sensibles**

Technique	Sensitivity	Optimal Application
Sanger sequencing	> 10%	Tumor tissue
Pyrosequencing	10%	Tumor tissue
Next-generation sequencing	2%	Tumor tissue
Quantative PCR	1%	Tumor tissue
ARMS	0.10%	Tumor tissue
BEAMing, PAP, Digital PCR, TAM-Seq	0.01% or lower	ctDNA, rare variants in tumor tissue

La sensibilité des techniques conventionnelles est **insuffisante** pour la détection d'altération en ADNtc pour la majorité des patients

Développement de méthodes sensibles et spécifiques :

- **PCR digitale** (BEAMing, ddPCR, etc.)
- **Séquençage massif** (TAm-Seq, Safe-SeqS, CAPP-Seq, etc.)



Diaz LA Jr, Bardelli A. J Clin Oncol. 2014. PMID: 24449238
 Donaldson J, Park BH. Annu Rev Med. 2018. PMID: 28846488.

PCR digitale : ddPCR (droplet digital PCR)

« **Digitalisation** » de la PCR (dans chaque microréacteur, une amplification et le signal absent ou présent)

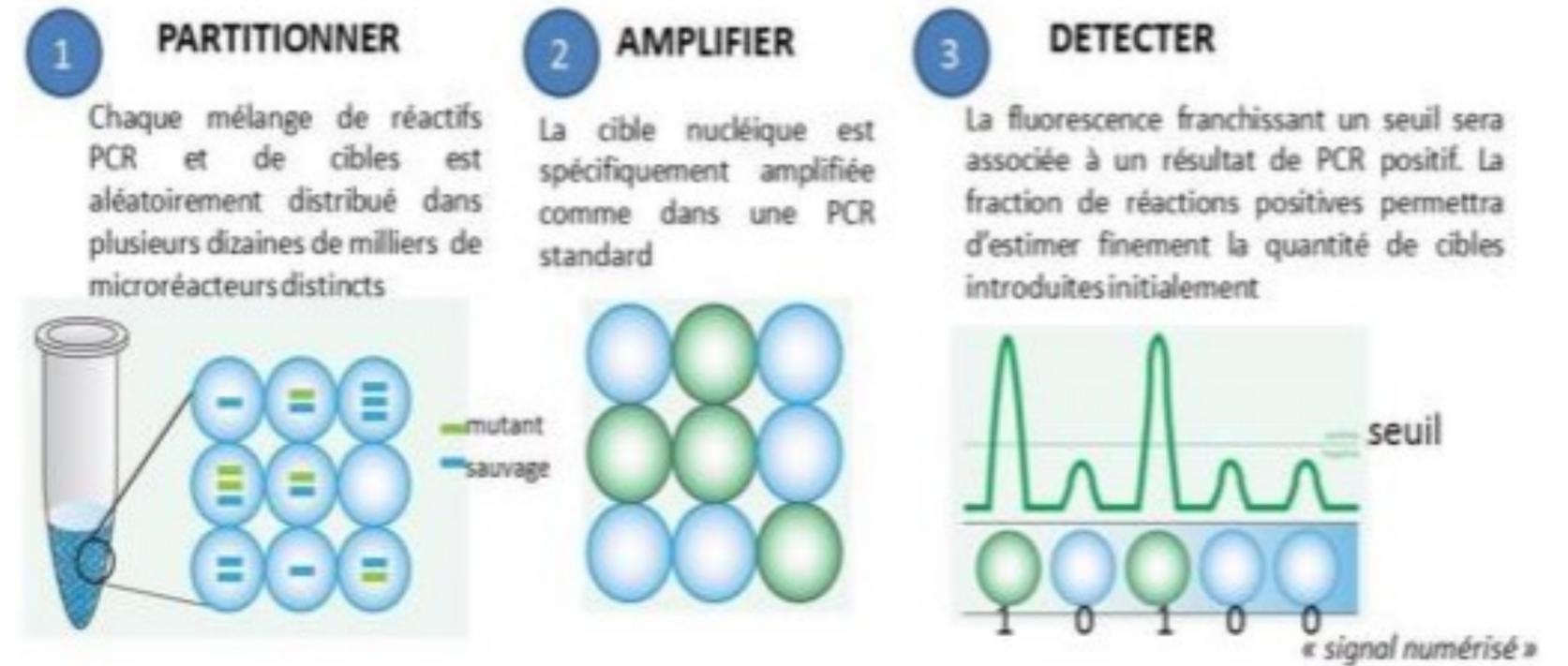
Augmentation de la sensibilité (VAF \geq 0,01%)

Par rapport aux séquençages haut débit :
Interprétation « **facile** »

Plateforme **moins lourde**

Coûts **moindres**

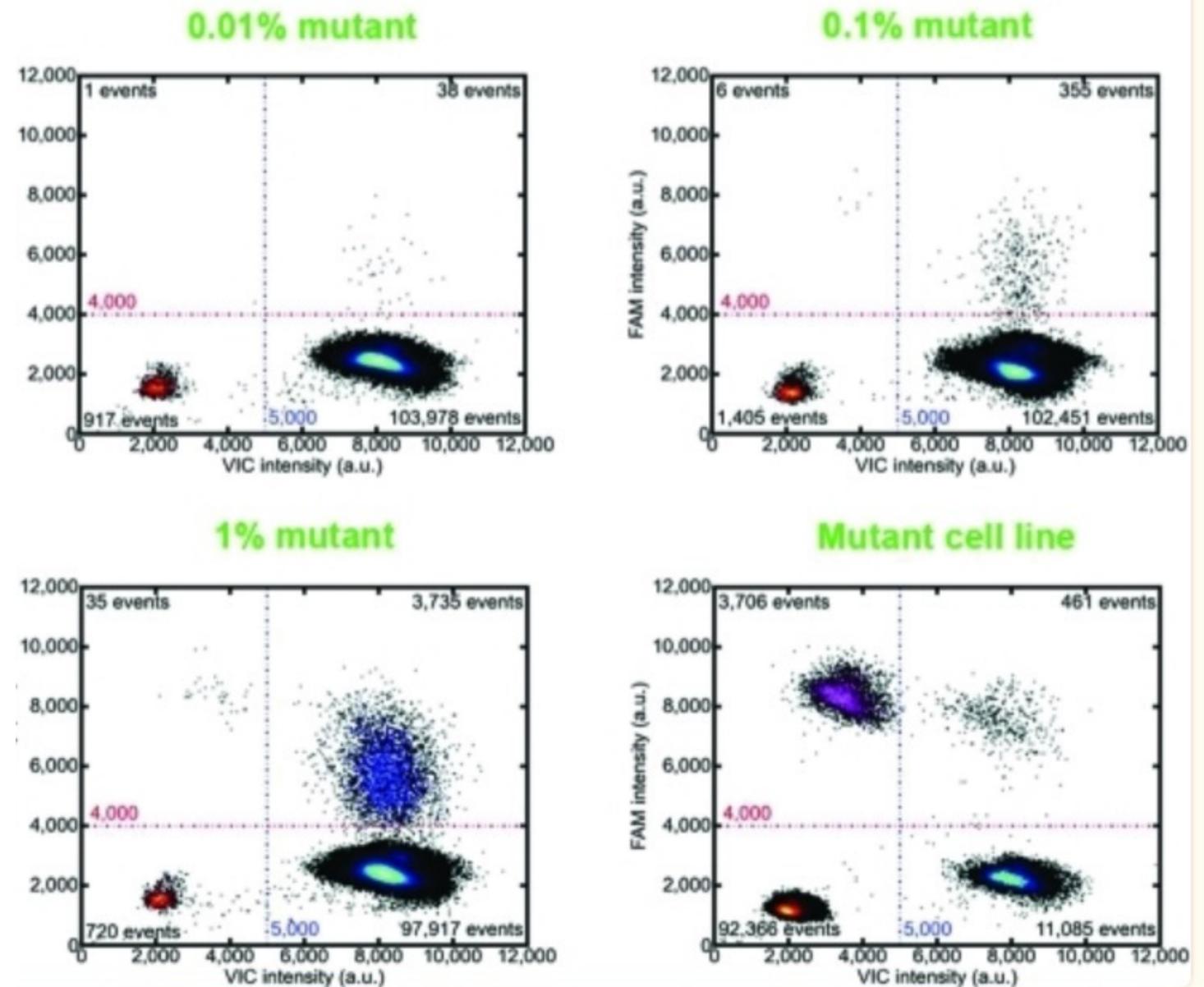
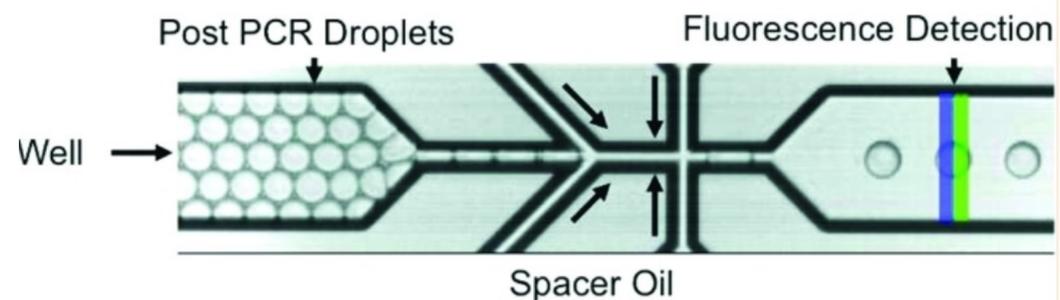
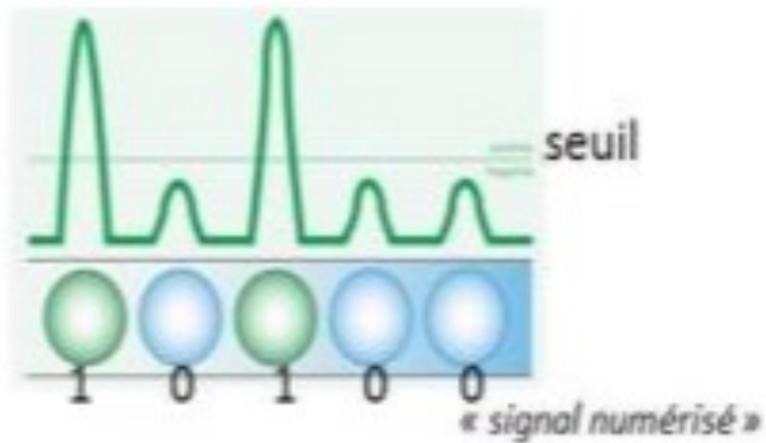
Quelques altérations seulement possibles



PCR digitale : ddPCR – exemple de résultat

3 DETECTER

La fluorescence franchissant un seuil sera associée à un résultat de PCR positif. La fraction de réactions positives permettra d'estimer finement la quantité de cibles introduites initialement



Détection de *BRAF* V600E

Séquençage haut débit

- Différentes méthodes :

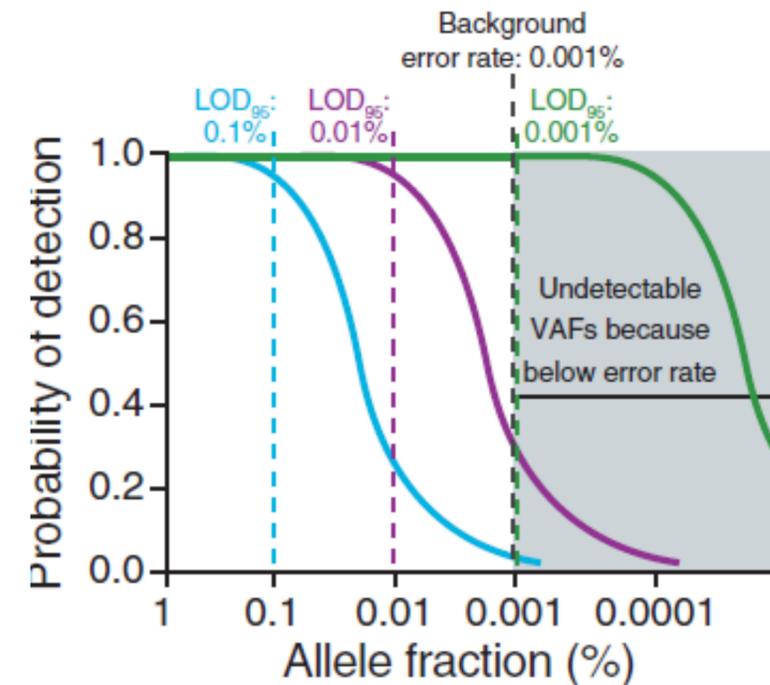
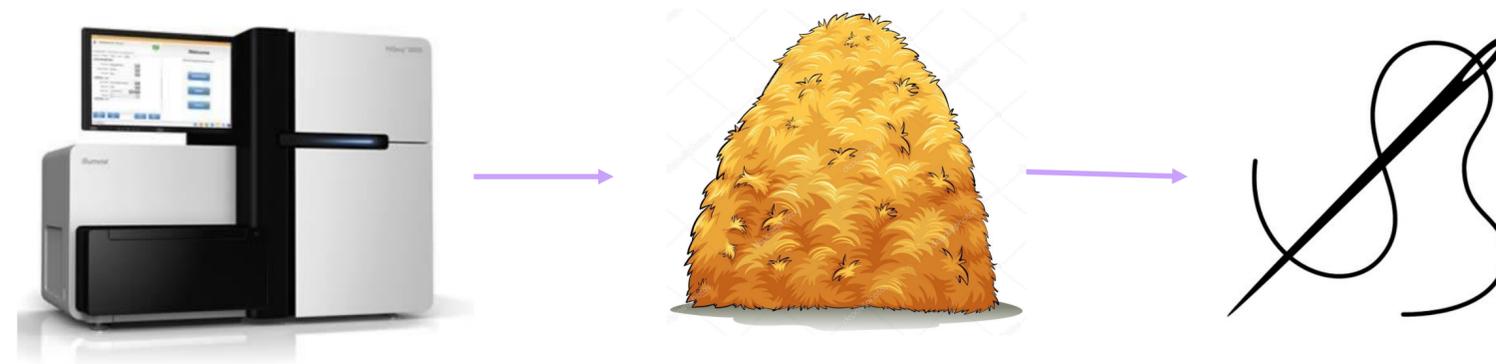
- Amplicon
- **Capture**
- WGS

- Ne se limite pas à quelques altérations

- Suivi de **l'hétérogénéité** tumorale

- Limitations :

- **Forte couverture** pour augmenter la sensibilité (coût, nombre de patients possibles par puce)
- Grande quantité d'ADNlc
- **Erreurs analytiques – Faux positifs/négatifs**
 - Capture (oxydation de l'ADN)
 - Erreur de la **polymérase**
 - Erreur de **séquençage**
 - Pipeline informatique...
 - Hématopoïèse clonale...
- **Interprétation plus complexe**

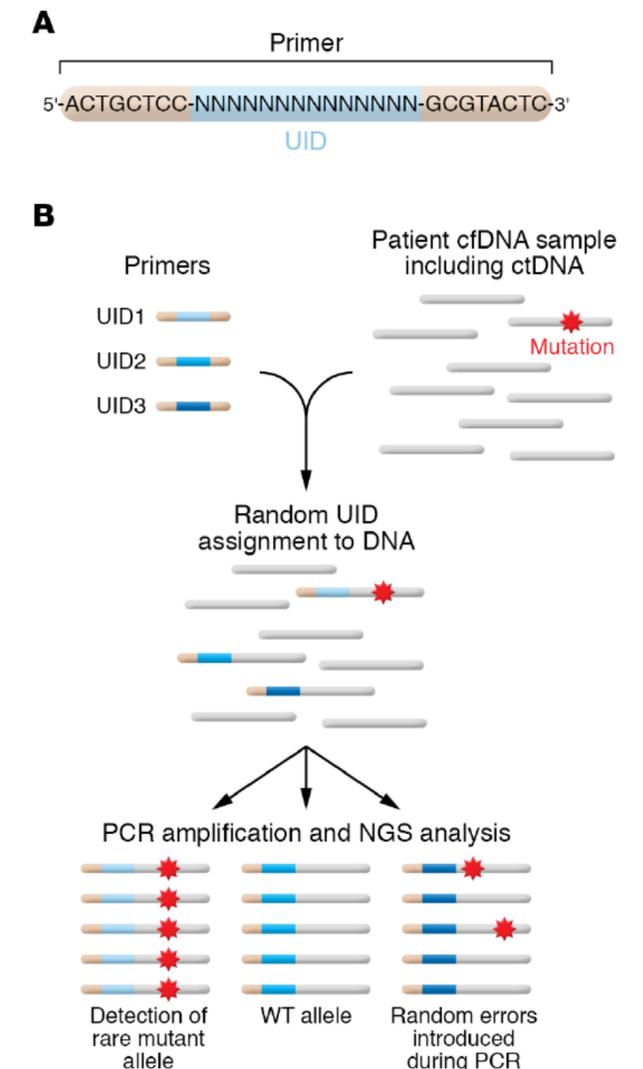
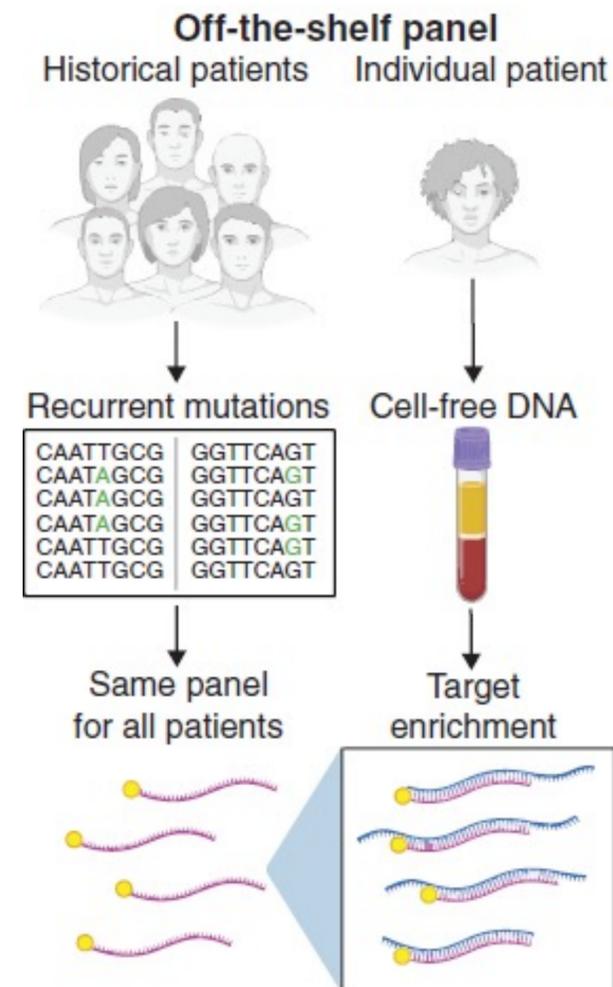


Mutations	cfDNA Input	Depth
+	+	+
++	++	++
+++	+++	+++

Dang DK, Park BH. J Clin Invest. 2022. PMID: 35703177
Moding EJ et al. Cancer Discov. 2021. PMID: 34785539

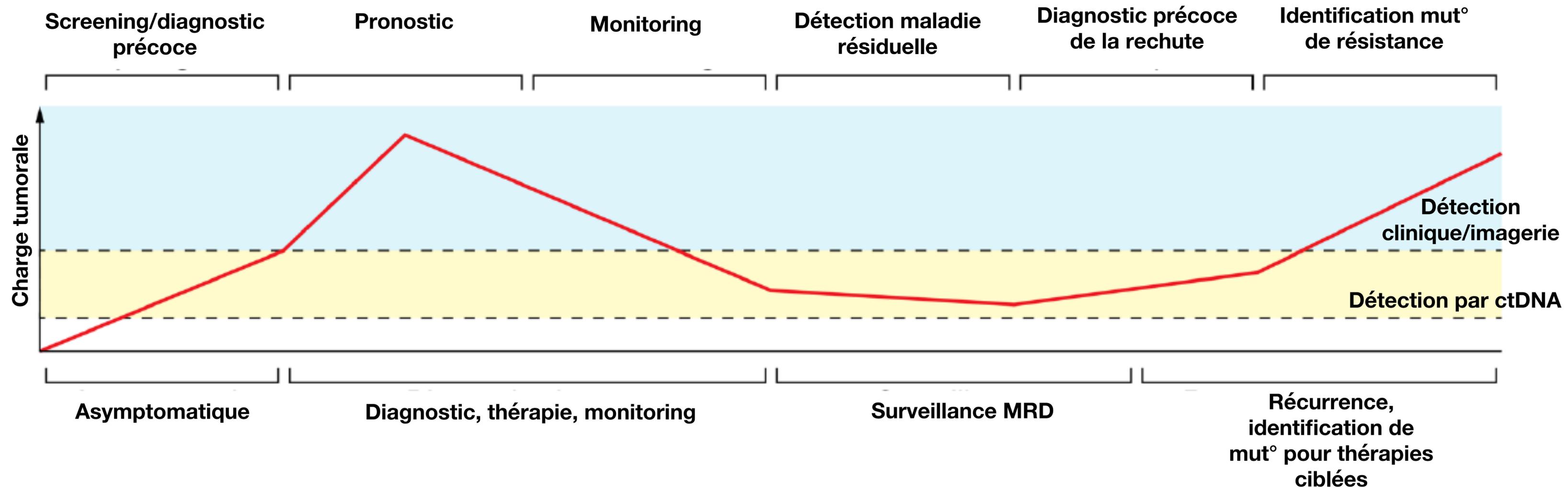
Séquençage haut débit : CAPP-Seq

- **Connaissance** des altérations moléculaires **récurrentes** selon le cancer
- Design d'un panel permettant de retrouver **au moins une altération pour > 95% des patients.**
- Panel avec une **taille totale limitée** (125 kb pour le poumon par ex) pour permettre une **forte couverture** (augmenter la sensibilité) sans augmenter les coûts de séquençages.
- Augmentation de la sensibilité et de la spécificité par :
 - Des code-barres moléculaires (UMI)
 - Connaissance du bruit de fond de la méthode
- Sensibilité de **92%** et **spécificité** de **96%** pour détection de mutation d'intérêt *EGFR* dans jusqu'à $4/10^5$ molécules d'ADNlc (= **VAF 0.025%**)

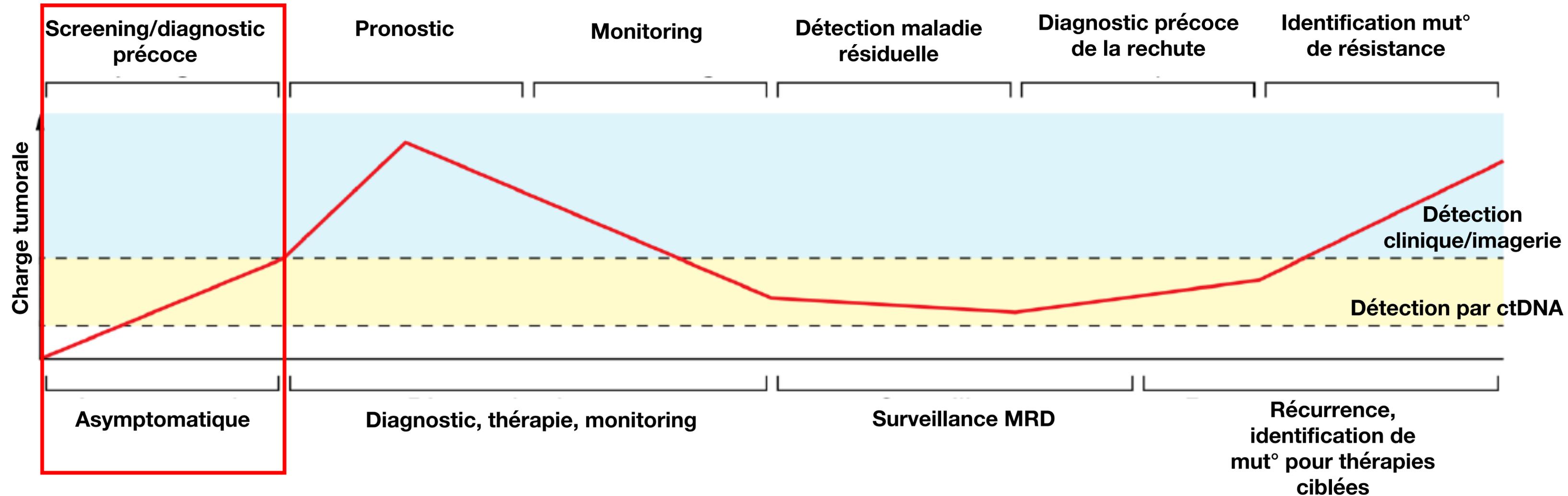


Newman AM et al. Nat Med. 2014. PMID: 24705333
Newman AM et al. Nat Biotechnol. 2016. PMID: 27018799
Moding EJ et al. Cancer Discov. 2021. PMID: 34785539
Dang DK, Park BH. J Clin Invest. 2022. PMID: 35703177

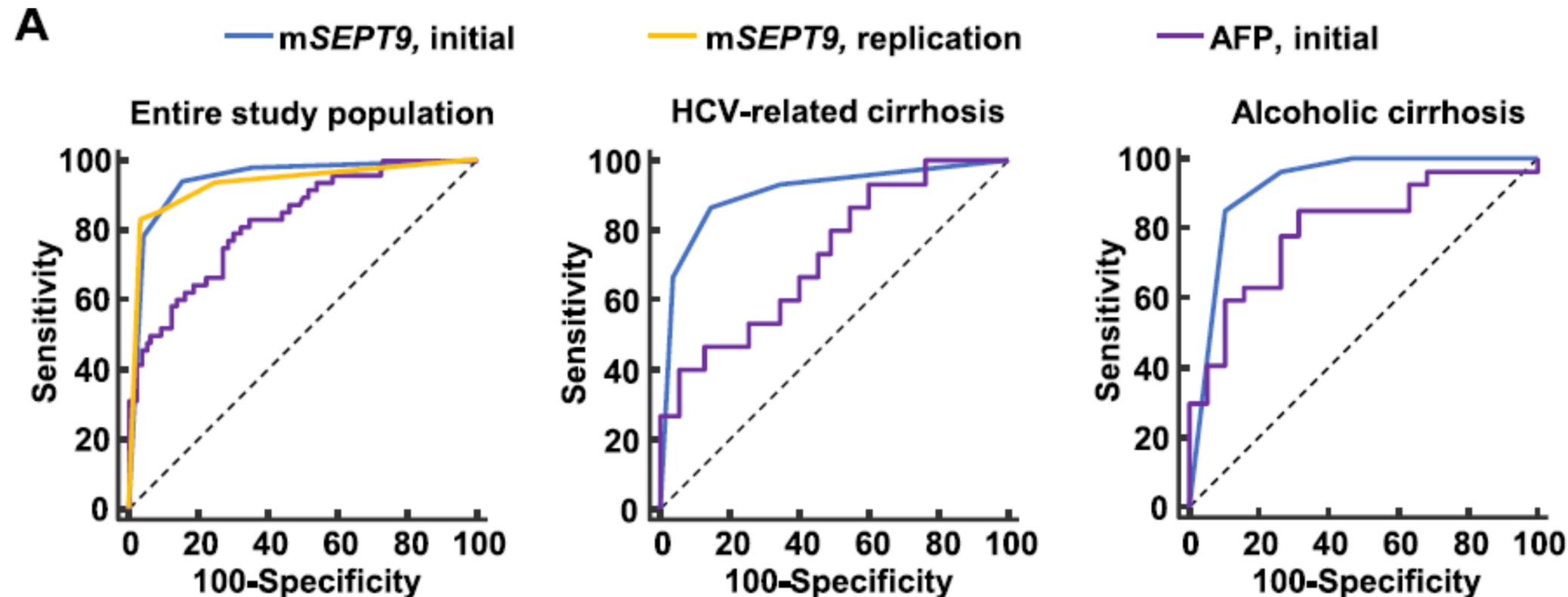
Utilités potentielles



Utilités potentielles - screening



Utilités potentielles - screening



Oussalah et al. : diagnostic du **carcinome hépatocellulaire** chez les patients cirrhotiques

Comparaison mSEPT9 vs AFP > 20 ng/mL (étude observationnelle)

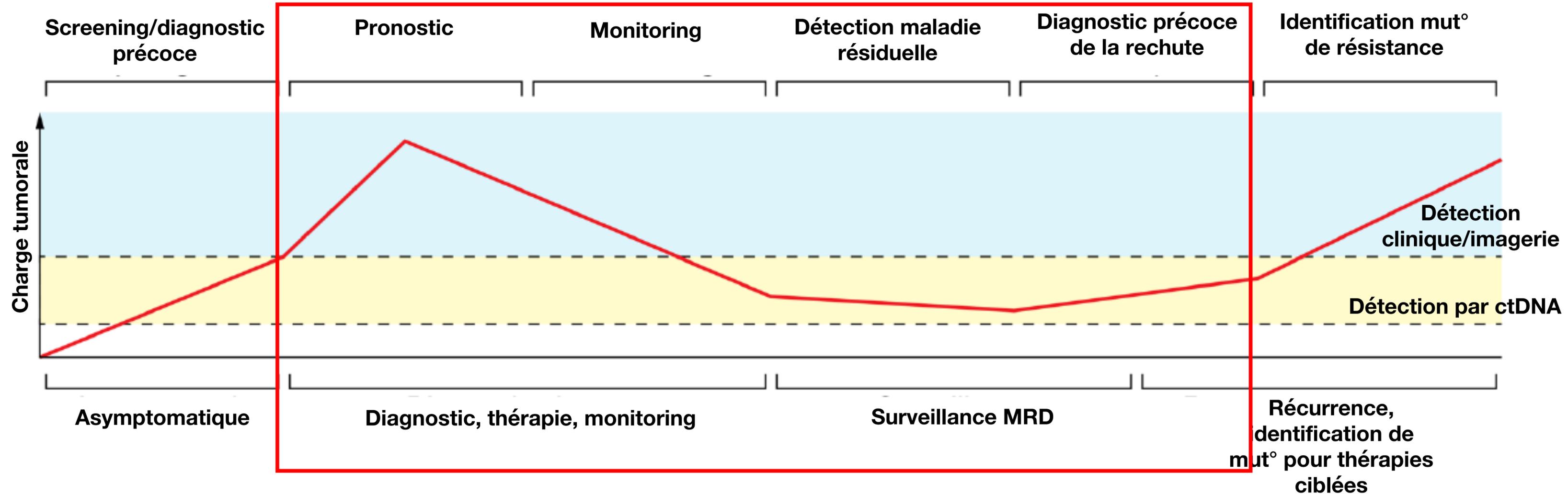
Kit commercial Epi proColon 2.0 CE

Patient : 186 dans l'étude initiale, 103 dans la réplication

AUROC mSEPT9 0,94

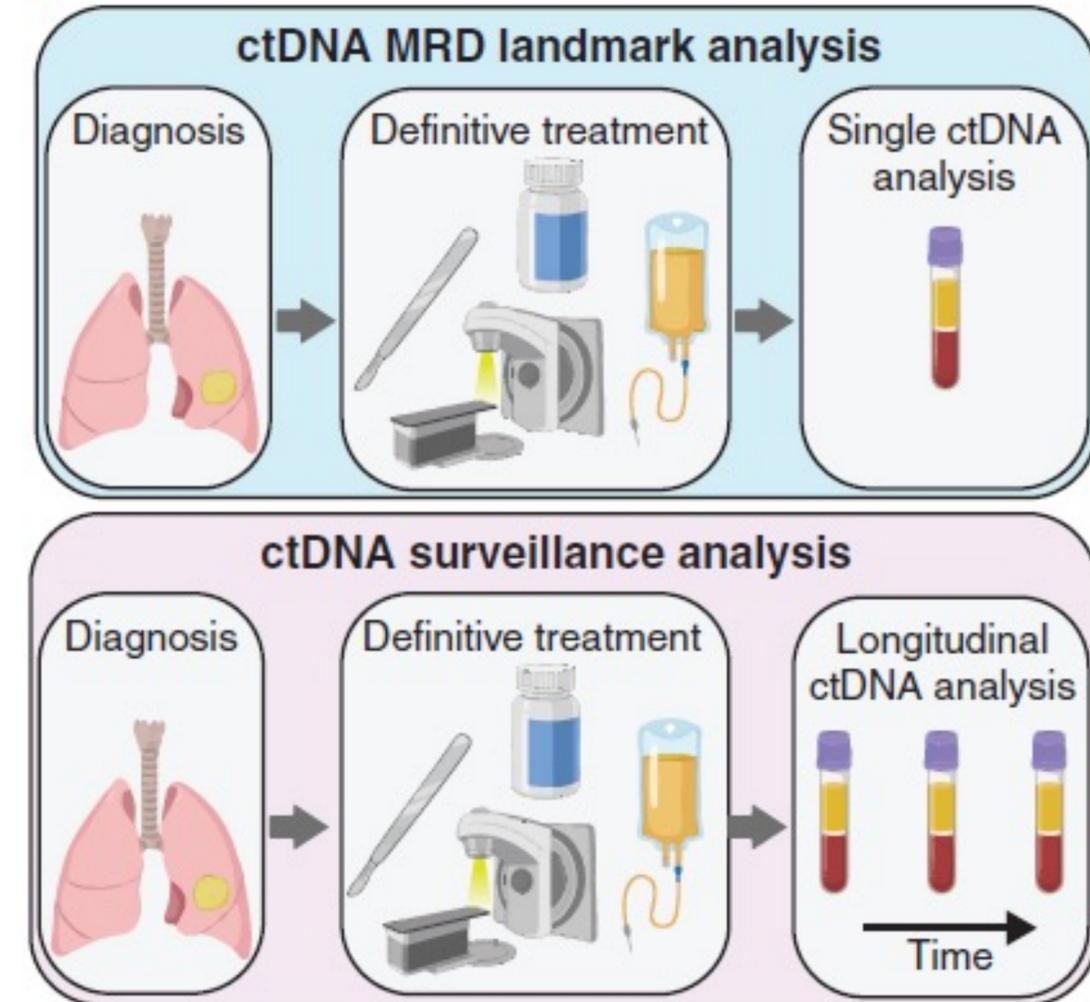
vs AFP : différence AUROC 0,115

Utilités potentielles – Pronostic

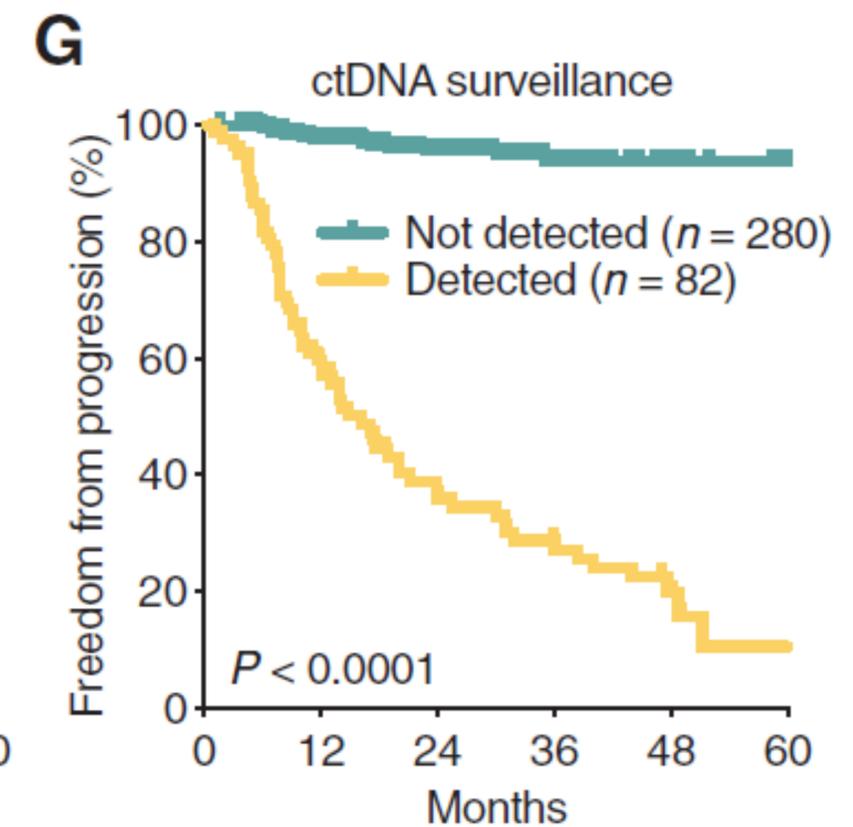
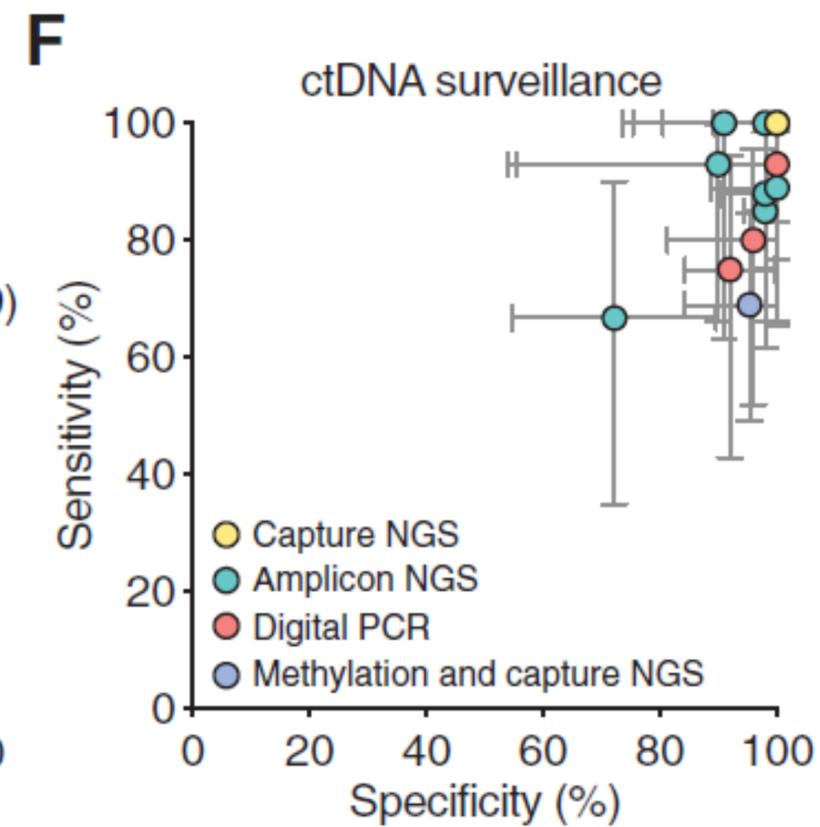
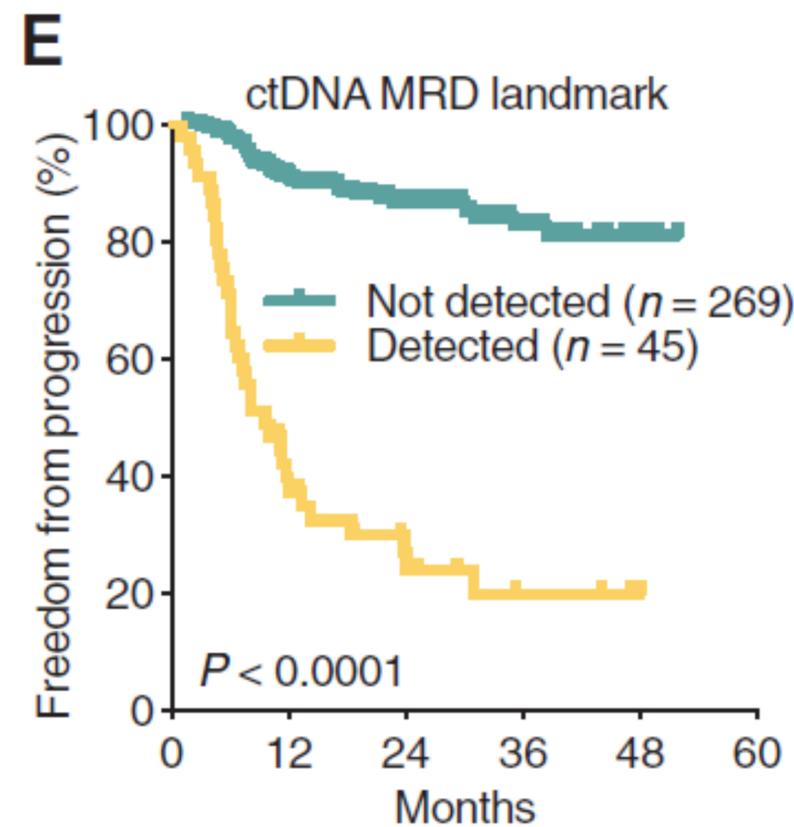
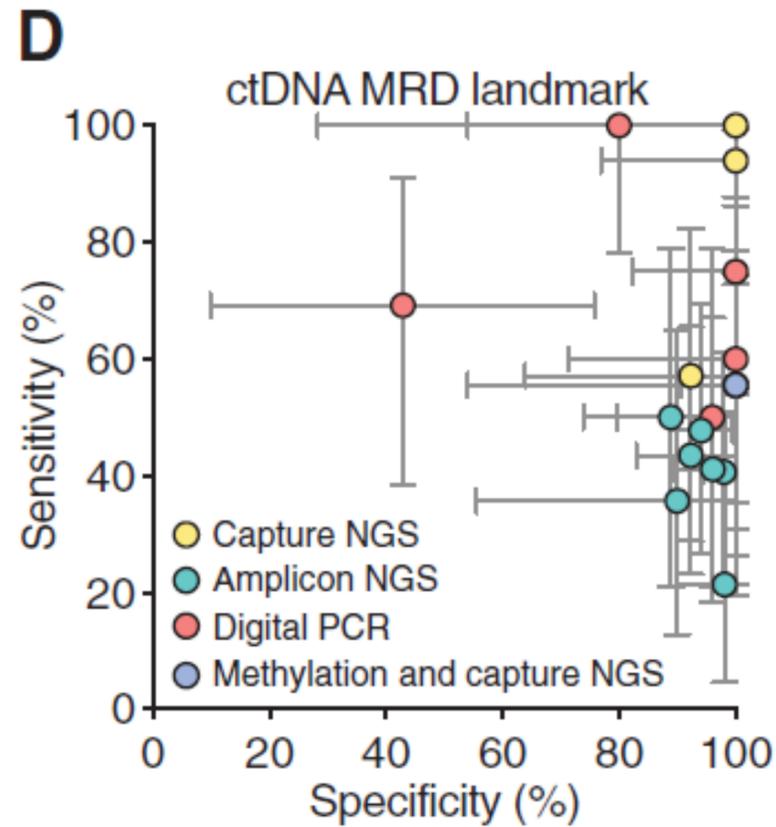


Utilités potentielles – Pronostic

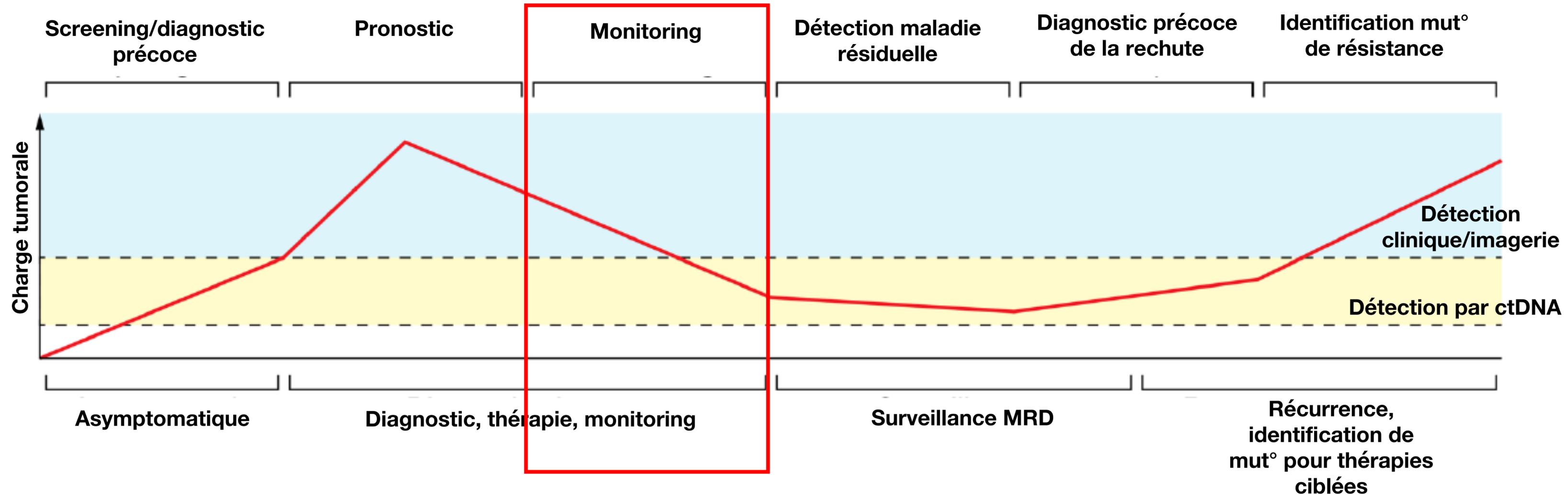
- Environ 2/3 des patients avec tumeurs solides :
 - **Locorégionales**
 - Possibilité d'un traitement **définitif**
- Post traitement définitif :
 - **Rechute** possible par expansion clonale de cellules cancéreuses résiduelles (indétectable clinique/imagerie)
 - **Thérapie adjuvante/consolidation**
- **Bénéfice/risque** de thérapie adjuvante/consolidation ?
 - Selon les cas, parfois la majorité des patients sont guéris par le traitement définitif
- ADNtc : **biomarqueur** pour guider l'administration de thérapie adjuvante/consolidation



Utilités potentielles - pronostic



Utilités potentielles - monitoring



Utilités potentielles - monitoring

Dawson et al :

30 patientes atteintes de cancer du sein

Suivi de la charge tumorale pour **monitoring du traitement**

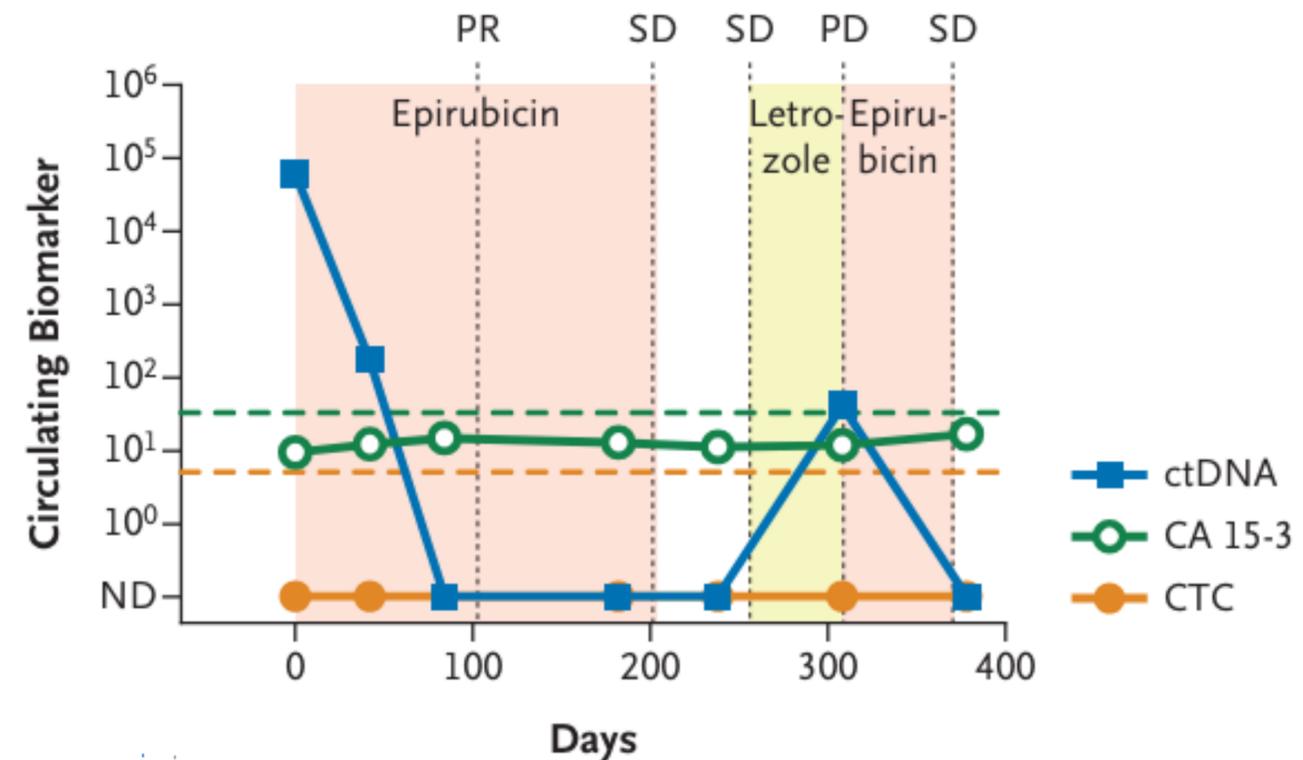
3 biomarqueurs :

- CA15-3
- CTCs
- ctDNA

RESULTS

Circulating tumor DNA was successfully detected in 29 of the 30 women (97%) in whom somatic genomic alterations were identified; CA 15-3 and circulating tumor cells were detected in 21 of 27 women (78%) and 26 of 30 women (87%), respectively. Circulating tumor DNA levels showed a greater dynamic range, and greater correlation with changes in tumor burden, than did CA 15-3 or circulating tumor cells. Among the measures tested, circulating tumor DNA provided the earliest measure of treatment response in 10 of 19 women (53%).

C Patient 20

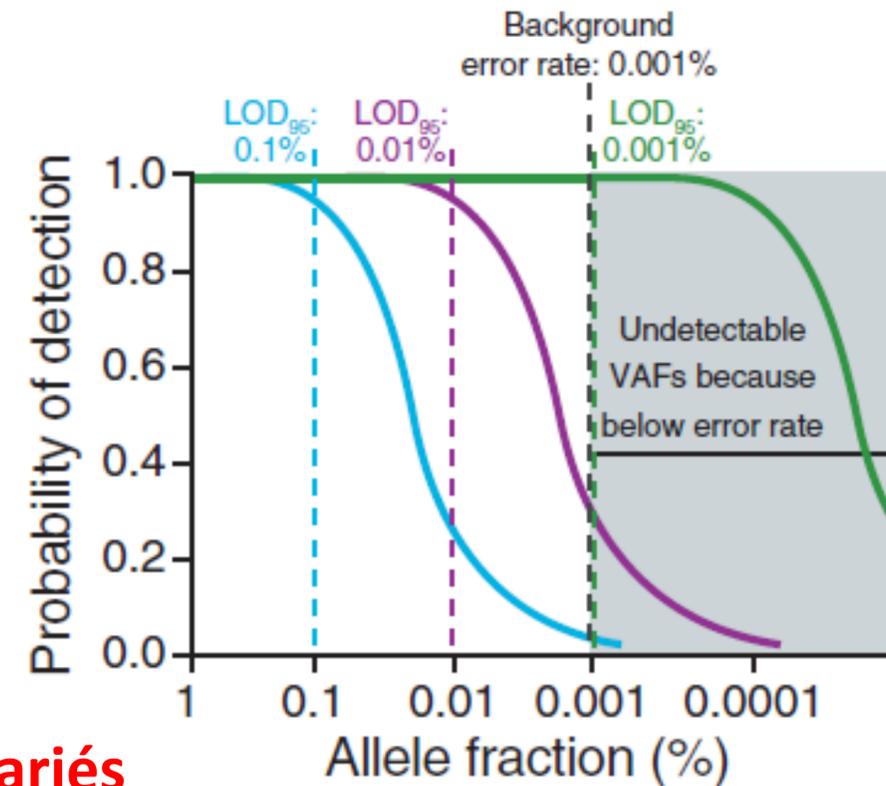


Avant passage à la routine - technique

Détermination précise des limites de détection de chaque méthode

Standardisation nécessaire :

- 2018 : EEQ européen ADNtc *KRAS* et *BRAF* V600
 - 42 laboratoires
 - Protocoles d'extraction, de quantification et d'analyses **variés**
 - **6,09% d'erreurs totales**
 - Plus hautes erreurs analytiques : Sanger/ plus faible ddPCR
- Erreurs techniques
 - **Contamination** possible entre échantillons/environnement etc.
 - Analytiques/bioinformatiques/etc.
 - Bonnes pratiques nécessaires et à diffuser

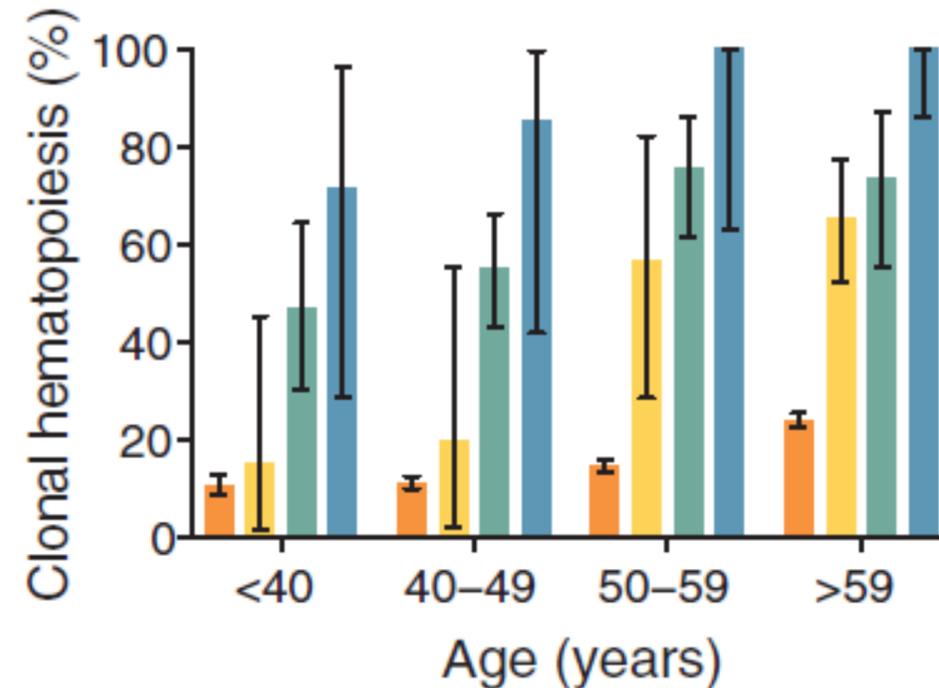


	Mutations	cfDNA Input	Depth
Blue	+	+	+
Purple	++	++	++
Green	+++	+++	+++

Avant passage à la routine - biologie

Hématopoïèse clonale de signification indéterminée

- Mutations acquises dans les cellules sanguines
- **Détection incidente** : probabilité augmente avec l'âge, la taille du panel, la profondeur
- Faible VAF, gènes principaux: *JAK2*, ***TP53***, *GNAS*, *IDH2* et ***KRAS***
- **CBNPC** : jusqu'à **15% des mutations *TP53* dans l'ADNlc sont attribuables à la HCPI**
- Possibilité de les éliminer en séquençant les leucocytes en parallèles du plasma (coût)

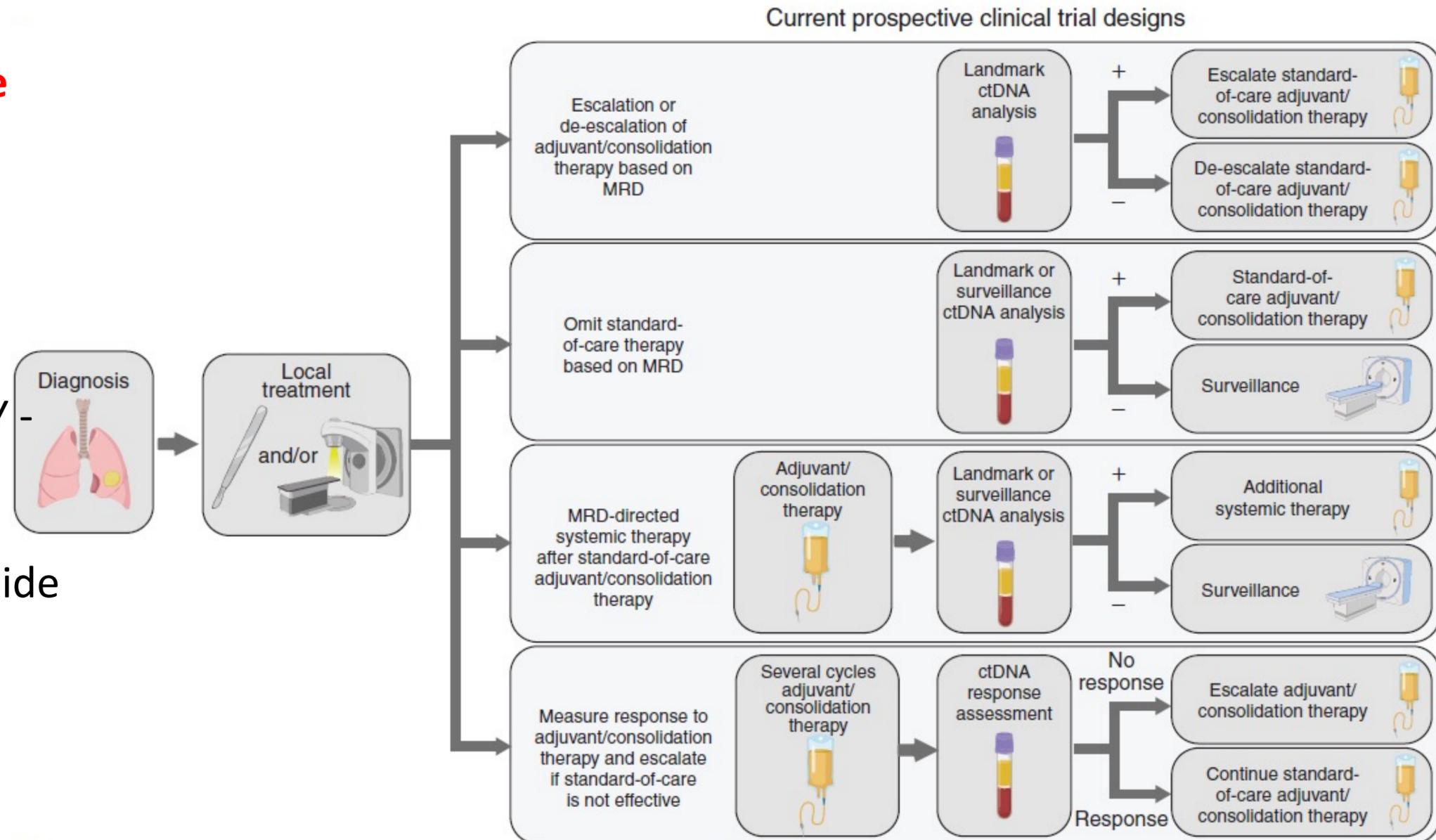


Panel size	Sequencing depth	Reference
~30 Mb	95x	75
355 kb	4,075x	46
~1.6 Mb	380x	76
2.1 Mb	4,400x	77

Avant passage à la routine – essais cliniques

Etudes cliniques interventionnelles de forte puissance, basées sur les résultats d'ADNtc pour guider la prise de décision :

- Screening (K-DETECT)
- Thérapie adjuvante/consolidation (GALAXY - CIRCULATE-Japan)
- Tests compagnons biopsie standard vs liquide
- Monitoring – détection de mutations de résistance (PADA-1)



Take home message

ADNlc et ADNtc dans la prise en charge des cancers

Biomarqueurs prometteurs, tout autant que les aneuploïdies foétales

Technologies matures mais nécessité de **standardisation**

Bonnes pratiques à **diffuser**

Confirmation de l'intérêt initial/théorique par les résultats **d'études cliniques**

Définir les modalités de remboursement

Encore un peu de **patience...**

Si l'aventure vous intéresse



INSTITUT UNIVERSITAIRE
DU CANCER DE TOULOUSE
Oncopole

1 avenue Irène Joliot-Curie
31059 TOULOUSE Cedex 9
www.iuct-oncopole.fr

POSTE d'ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE (AHU)

Poste disponible en **Novembre 2024**

IUCT-Oncopole et Faculté de Santé de Toulouse, Département Pharmacie

Spécialisation Biologie Moléculaire, biopsie liquide et biochimie cancérologique

Merci pour votre attention

