

JOURNÉES DU
GFCO 10^e ÉDITION

Biomarqueurs et analyses moléculaires en oncologie

**ADN circulant
En dehors du plasma**

Étienne Rouleau, Institut Gustave Roussy, Paris

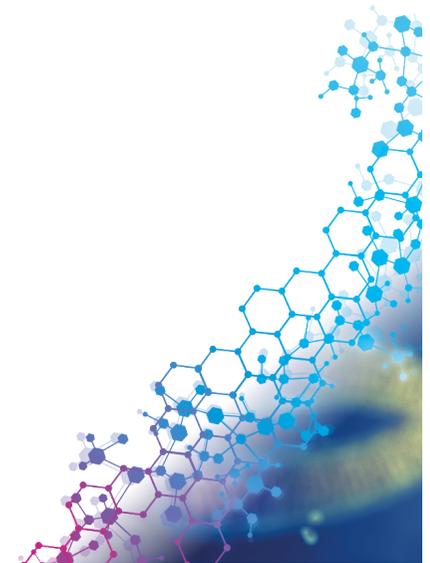
Avec la participation
scientifique du



LIENS D'INTÉRÊT

- **Etienne ROULEAU**

- Expert – AstraZeneca, BMS, Roche
- Conference – BMS, AstraZeneca, Clovis, MSD, Roche, GSK
- Research grant - AstraZeneca

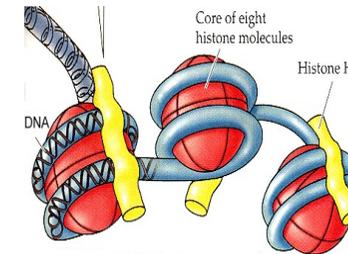


Rappels

ADN circulant

ADN circulant dans du liquide acellulaire

- **ADN fragmenté**
 - 166 paires de bases
 - Associés à l'apoptose
 - **ADN de plus grande taille n'est pas du ctDNA**
 - **ADN concentration**
 - Individu sain : <5 ng / mL (0 to 128 ng / mL)
 - Individu avec cancer : 137 ng / mL (0 to 4738 ng / mL)
- van der Vaart et al. Is the role of circulating DNA as a biomarker of cancer being prematurely overrated? *Clinical Biochemistry* 43 (2010) 26–36.
- **Fraction Allélique : 0.01% à plus de 90%**

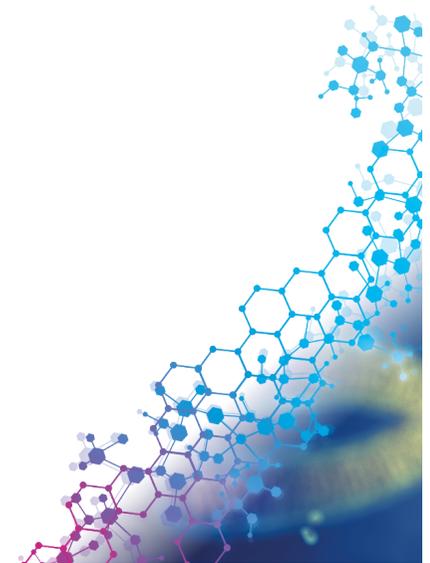


Aptoptosis 166 pb
Range 88-166
Necrosis : >300 pb
Germline DNA > 15kb

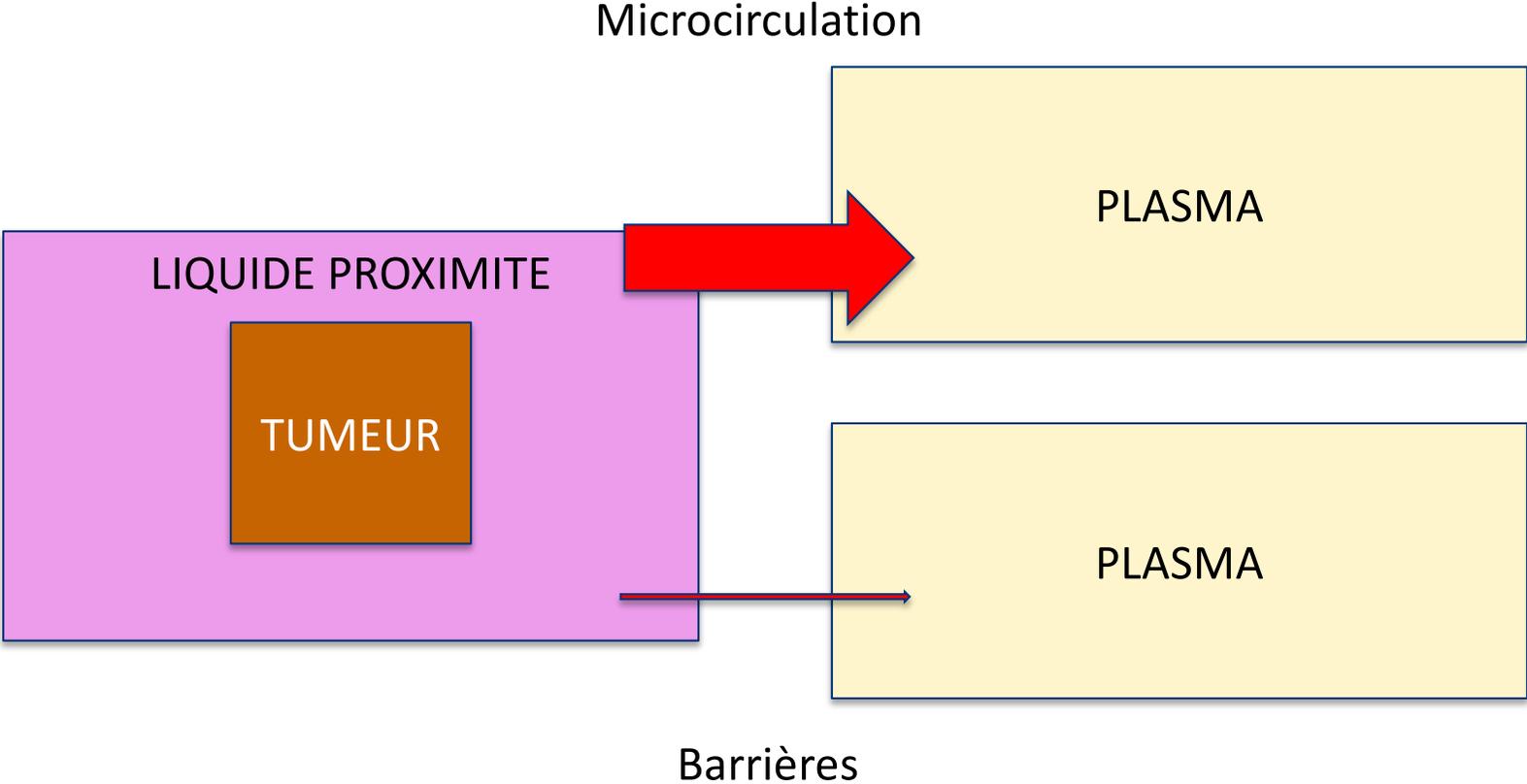


Approches Non Plasmatiques en Biopsie Liquide

- **Biopsies liquides non plasmatique : alternatives au plasma pour le ctDNA.**
- **Fluides corporels : LCR, urine, salive, ascite, bile**
- **Applications :**
 - Cancers cérébraux
 - Métastases cérébrales
 - Cancers urologiques
 - Cancers gynécologique
 - Cancers pulmonaires

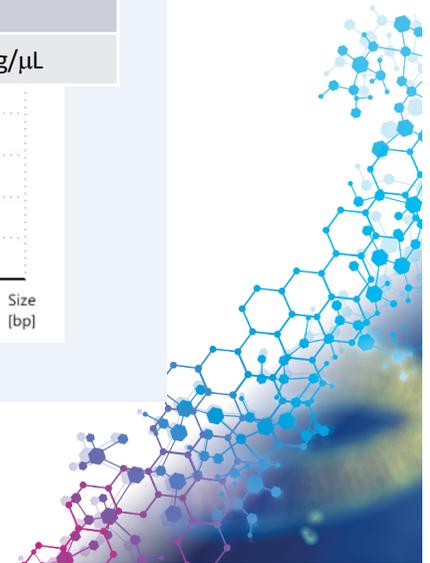
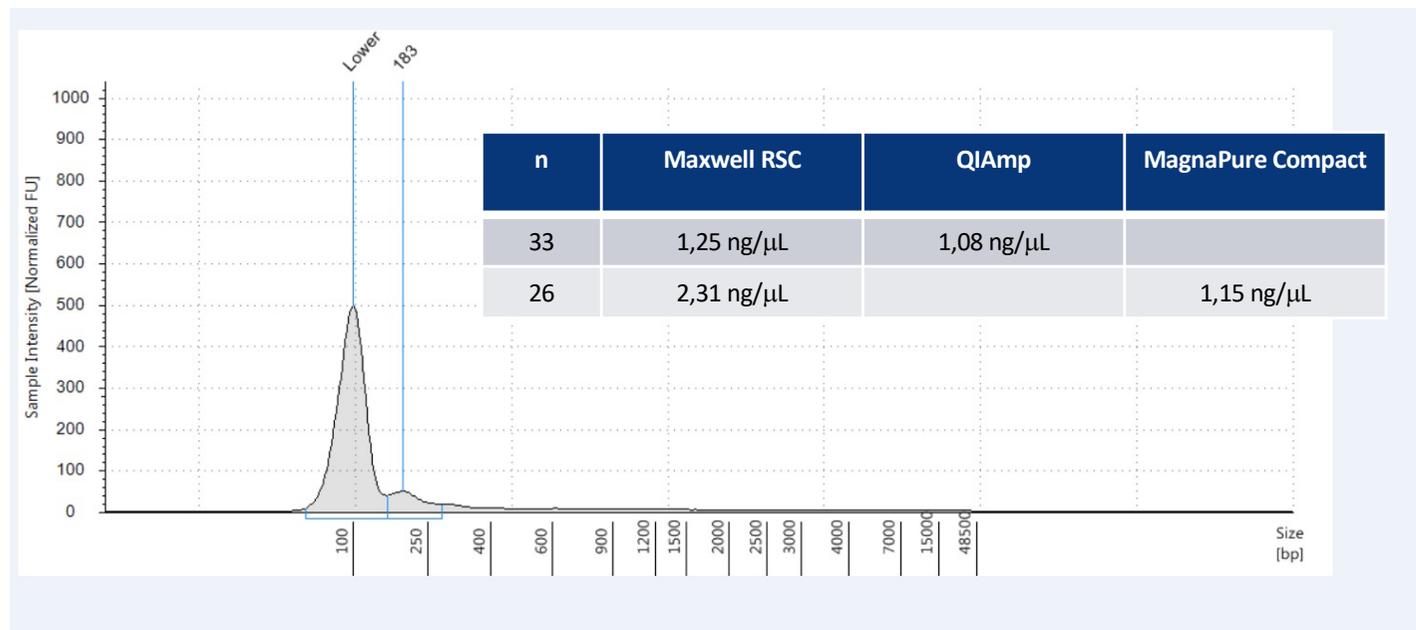


Compartimentation Proximité

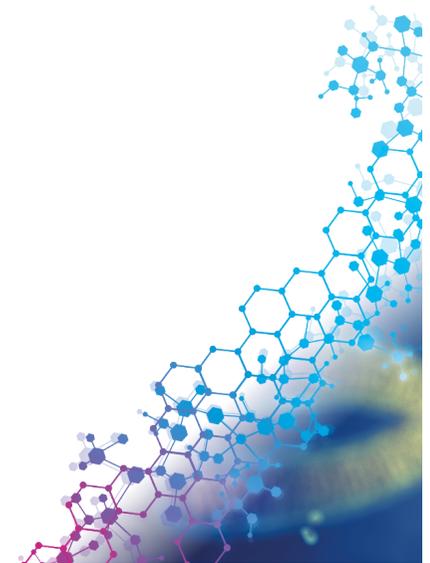
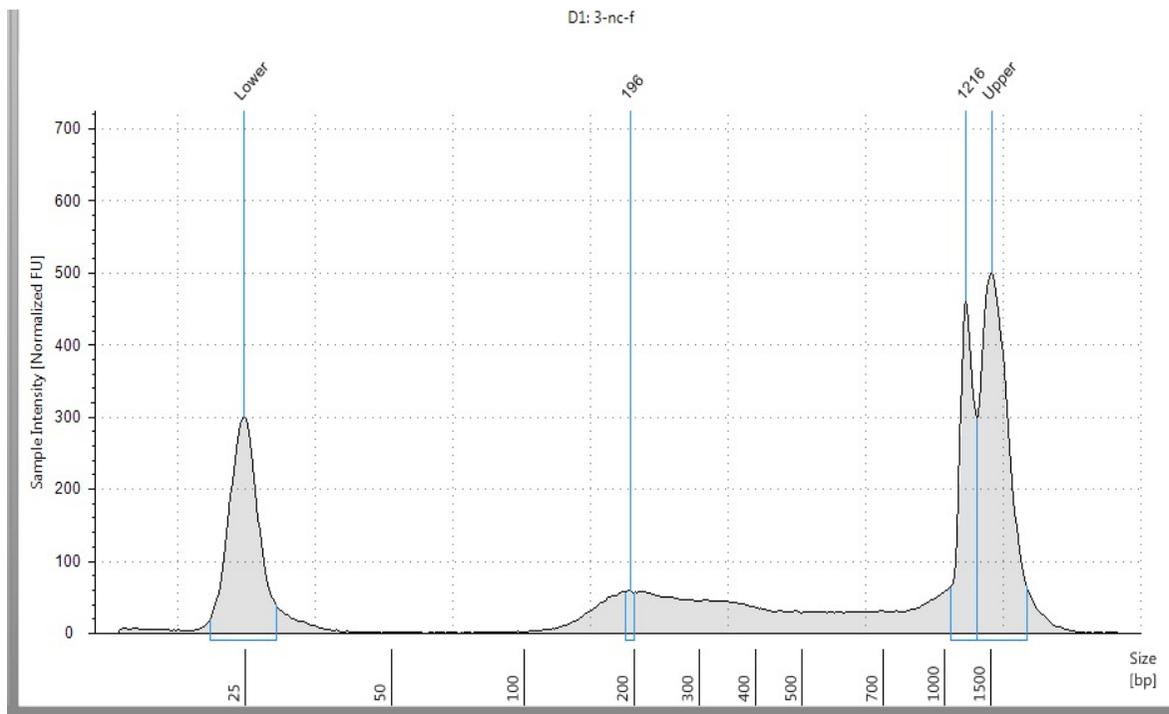


ADN circulant = ADN fragmenté Plasma

Fragment analysis of cfDNA – 183-bp

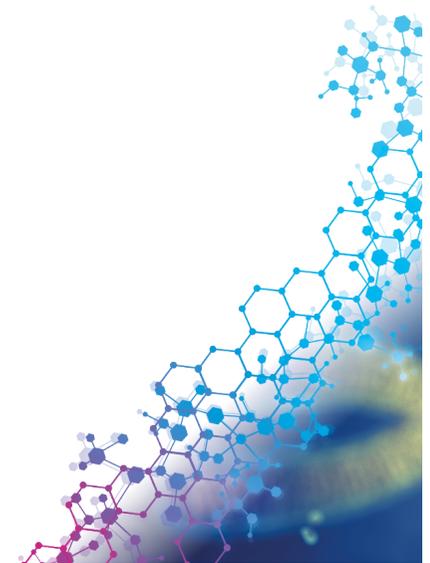
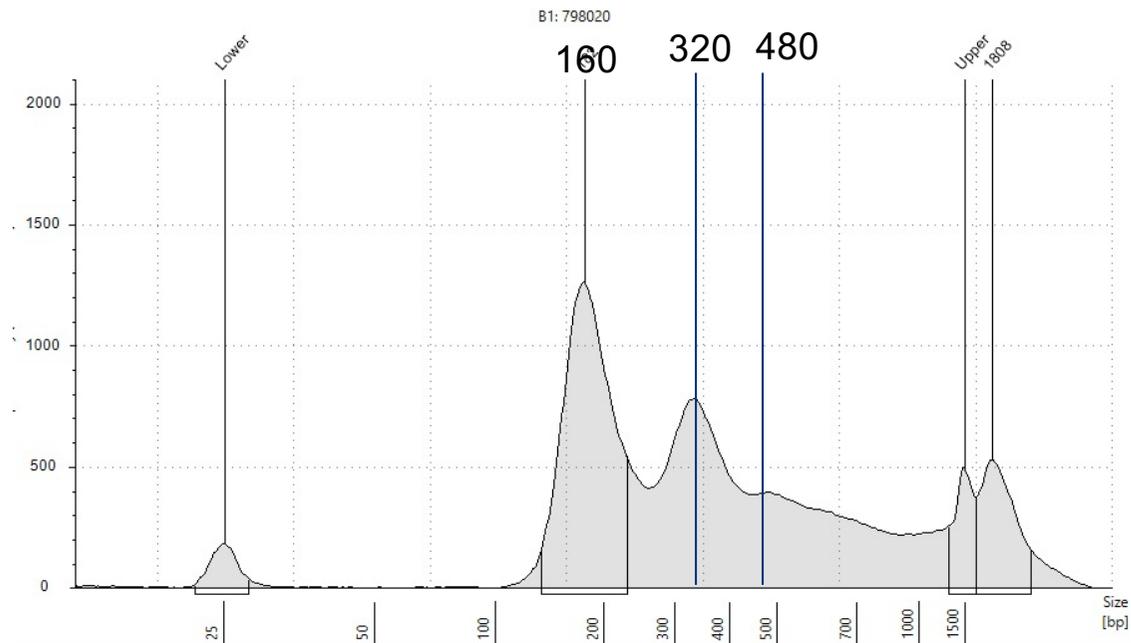


ADN circulant = ADN fragmenté Urine



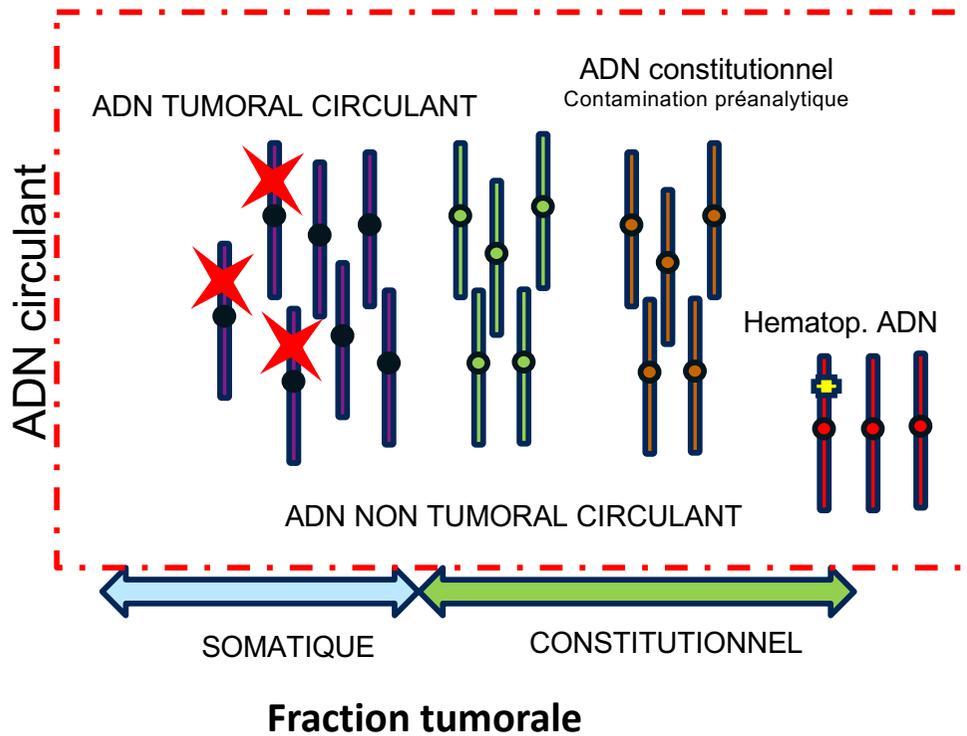
ADN circulant = ADN fragmenté Liquide d'ascite

ADN circulant ascite

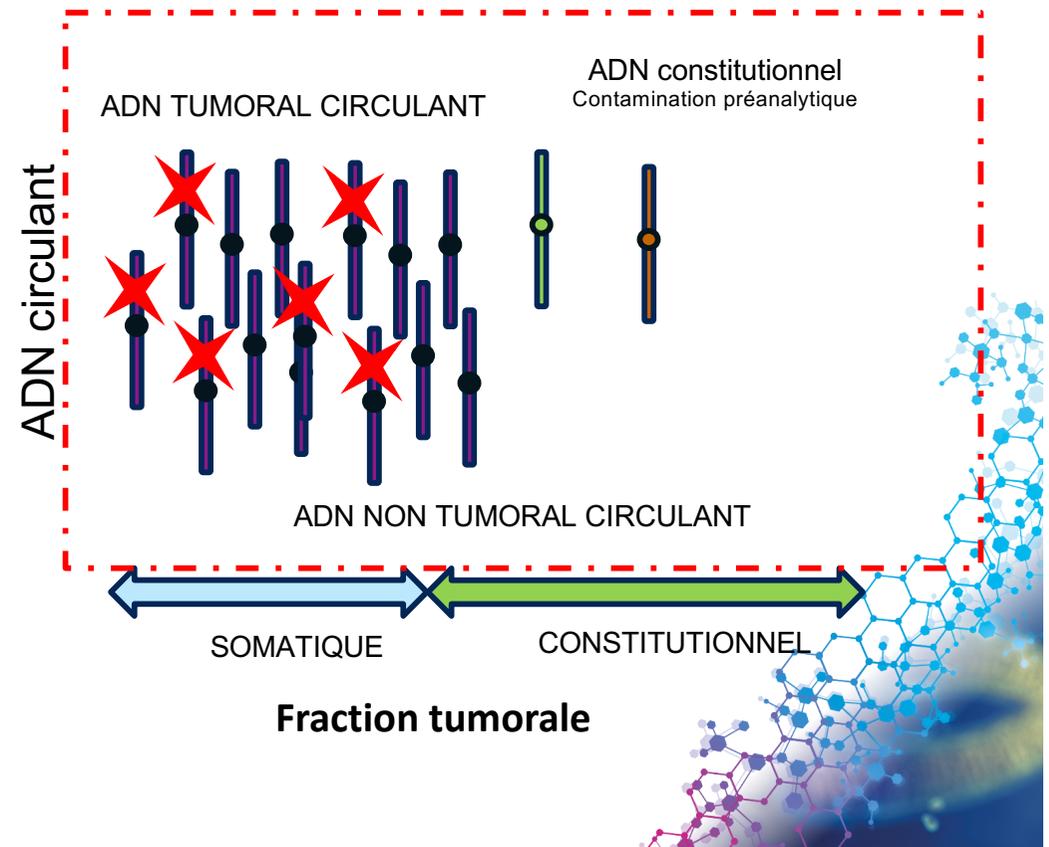


COMPARAISON PLASMA / NON PLASMA

PLASMA



LIQUIDE PROXIMATE



Avantages et inconvénients du liquide non plasmatique

■ Avantages hors plasma

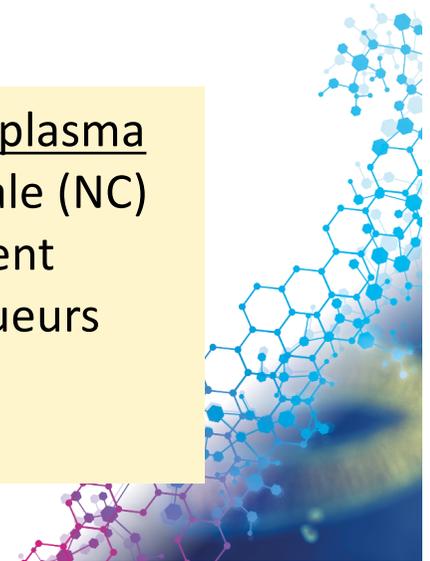
- Collecte peu invasive
- Rendement accru en ADNtc
- Charge tumorale
- Suivi de maladie localisée
- Suivi en temps réel
- Au plus proche de la tumeur
- Moins d'hétérogénéité
- Moins de contamination

■ Désavantages hors plasma

- Parfois moins accessible que le plasma (LCR...)
- Profil localisé et non métastatique

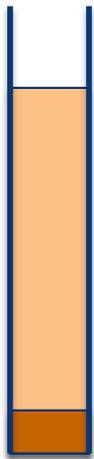
Applications cliniques de l'ADNtc hors plasma

- Alternative à la biopsie tumorale (NC)
- Suivi de la réponse au traitement
- Profilage génomique de marqueurs spécifiques
- Suivi des cancers localisés



Préanalytique

Quelques enjeux



Surnageant

Culot cellulaire

- Standardisation du workflow
- Circuit avec la pathologie (cellules)
- Prélèvement spécifique
- Tubes stabilisants (Paxgene, Roche, Streck)
- Volume (min LCR / max Urine)
- Extractions
- Fragmentation ?

Retour d'expérience – liquide / cellules ?



Exemples d'applications



Liquide d'ascite

- **Tubes spéciaux**

- **Avantages**

- Compatible avec de faibles volumes de liquide péritonéal (<100 mL).
- Idéal pour les cas où les échantillons tumoraux sont de mauvaise qualité.
- Situation clinique courante d'avoir de l'ascite

- **Indications**

- Cancer gynécologique – cancer de l'ovaire / HRD



Expérience ?
Pré-analytique
Précautions ?

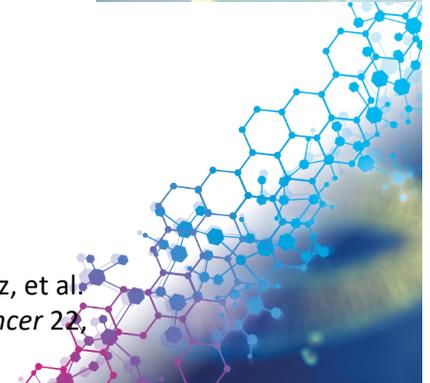
Liquide d'ascite

- **53 patientes de cancer de l'ovaire (19 rétrospectives, 34 prospectives).**
 - Séquençage génétique NGS pour TP53 et BRCA1/2.
 - sWGS pour évaluer l'instabilité génomique.
- **Détection d'ADN tumoral dans 92.5% des cas.**
- **Variants pathogènes : TP53 : 86% et BRCA1/2 : 24% (avec des mutations non détectées sur tissus tumoraux).**
- **Instabilité génomique :**
 - Succès à 100% via sWGS (vs 75% sur tissus tumoraux).
- **Rapide : Résultats en 21 jours (vs 45 jours pour les tissus tumoraux).**

Table 3 Assay Positive Predictive Value, Negative Predictive Value, Specificity, Sensitivity, and Concordance of TP53 pathogenic variant on acfDNA compared With Tumor Tissue

	AcfDNA Positive sample	acfDNA negative sample	Sensitivity, % (95% CI)	Specificity, % (95% CI)	Concordance, %	Cohen K, (P value)
Tissue Positive	35	1	97 (86–100)	83 (43 – 100)	95	0,81 (<0,001)
Tissue Negative	1	5				

Roussel-Simonin, Cyril, Felix Blanc-Durand, Roseline Tang, Damien Vasseur, Audrey Le Formal, Laure Chardin, Elisa Yaniz, et al. « Homologous Recombination Deficiency (HRD) Testing on Cell-Free Tumor DNA from Peritoneal Fluid ». *Molecular Cancer* 22, n° 1 (6 novembre 2023): 178..



Liquide d'ascite

Patiente de 60 ans avec carcinome séreux de haut grade de stade IIIC après chirurgie complète première.

■ ASCITE

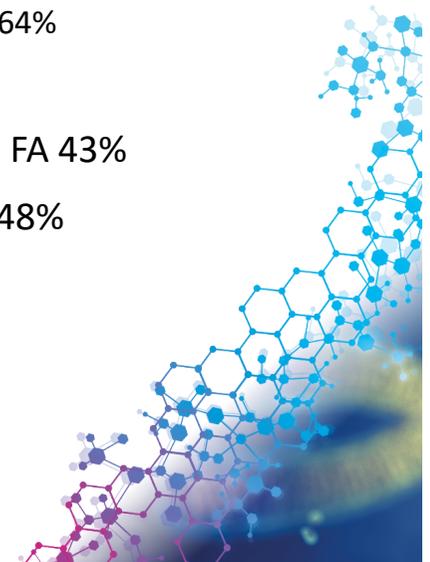
- Score GIS positif (score 8,1 Sophia – seuil à ZERO)
- Présence d'un variant délétère du gène *TP53*, c.1024C>T, p.(Arg342*) sur l'exon 10, FA 65%
- Présence d'un variant de classe 5 (pathogénique) du gène *BRCA1*, c.1944dup, p.Glu649fs sur l'exon 10, FA 64%

■ TUMEUR

- Présence d'un variant pathogénique du gène *BRCA1*, c.1944dupA, p.Glu649fs sur l'exon 10, FA 43%
- Présence d'un variant pathogénique du gène *TP53*, c.1024C>T, p.Arg342* sur l'exon 10, FA 48%
- Score GIS positif (score 0.80 Giscar – seuil à 0,48)

■ SANG

- Absence de la mutation du gène *BRCA1* en constitutionnel



LCR

- **Pré-analytique**

- Tubes secs
- Tubes spéciaux

- **Applications**

- Gliomes (mutations IDH1, TERT)
- Métastase cérébrale



Expérience ?
Pré-analytique
Précautions ?

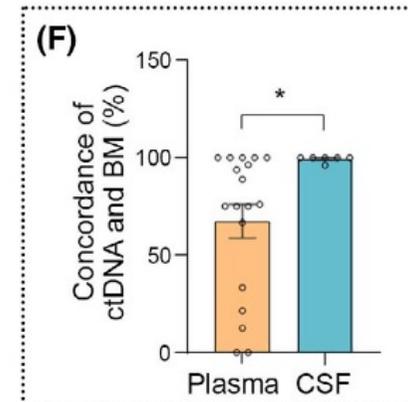
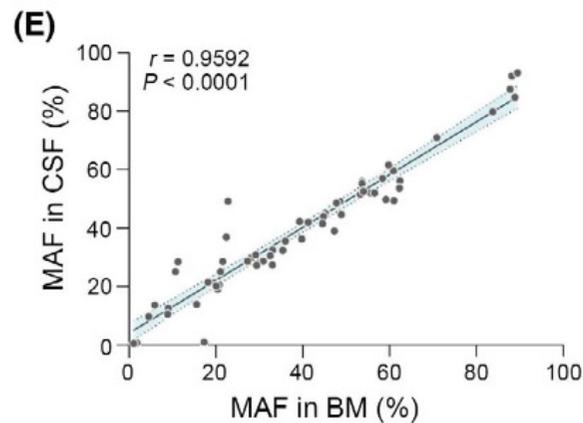
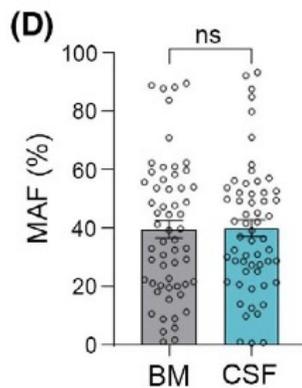
LCR

Applications – cancer du poumon

■ NSCLC avec métastases cérébrales.

- Comparaison : tumeurs primaires, métastases cérébrales, plasma et LCR.
- Techniques : Séquençage ADN pour 1021 gènes (Illumina, Roche NimbleGen).
- Plasma ctDNA : Détecte 27,78 % des mutations des BM, concordance 67,44 %.
- LCR ctDNA : Détecte **98,31 % des mutations des BM, concordance 99,33 %**.

Wu, Jun, Zhiqiang Liu, Tianxiang Huang, Ying Wang, Meng Meng Song, Tao Song, Gretchen Long, Xiaobing Zhang, Xi Li, et Longbo Zhang. « Cerebrospinal Fluid Circulating Tumor DNA Depicts Profiling of Brain Metastasis in NSCLC ». *Molecular Oncology* 17, n° 5 (mai 2023): 810-24.



LCR

Application cancer du poumon

■ Détection de progression méningée

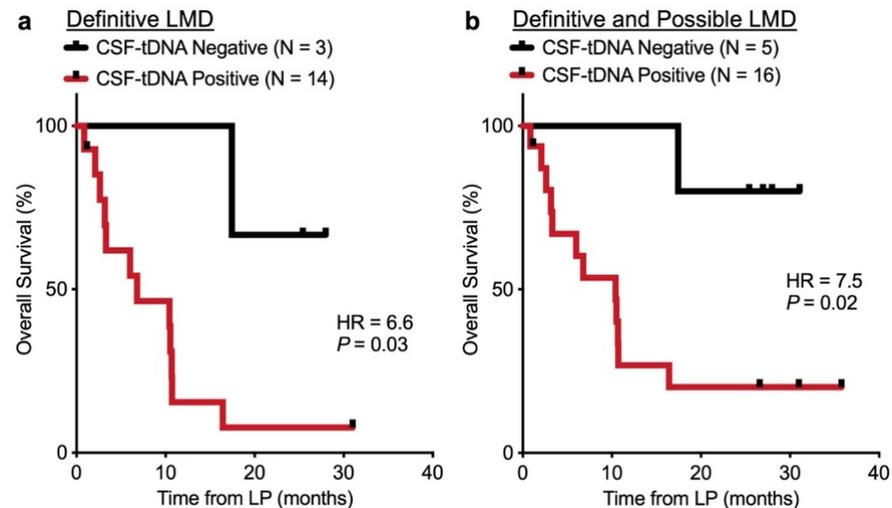
- La LMD affecte 10 % des patients atteints de cancers solides avec une survie médiane < 1 an.

Sensibilité pour le diagnostic de LMD :

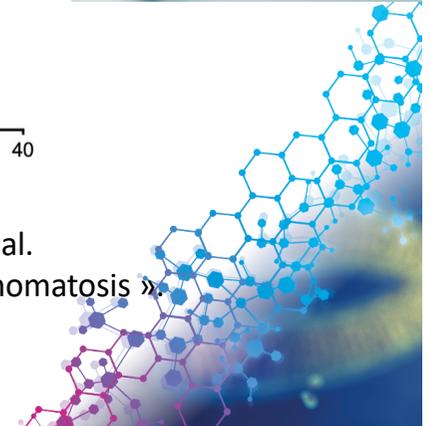
- - CSF-tDNA : 91,7 %
- - Cytologie : 81,8 %
- - IRM : 80 %

Concentrations médianes d'ADN tumoral :

- CSF : 32,7 %
- Plasma : 1,8 %



Azad, Tej D., Shigeki Nanjo, Michael C. Jin, Jacob J. Chabon, David M. Kurtz, Adel A. Chaudhuri, Ian D. Connolly, et al.
« Quantification of Cerebrospinal Fluid Tumor DNA in Lung Cancer Patients with Suspected Leptomeningeal Carcinomatosis »
NPJ Precision Oncology 8, n° 1 (28 mai 2024): 121..



LCR

Applications – cancer cérébraux

■ Sensibilité accrue dans le LCR : 74 %-86 % (vs <10 % dans le plasma).

- Applications cliniques :
 - - Diagnostique : Détection de mutations spécifiques (IDH1, TERT, H3K27M).
 - - Surveillance longitudinale : Suivi dynamique des mutations.
 - - Pronostic : Corrélation entre ctDNA élevé et issues défavorables.
- Concordance élevée entre le LCR et le tissu tumoral : 49 %-87 %.

■ GLIOMES

- Étude réalisée sur 85 patients atteints de gliomes (54 % GBM, 31 % grade III, 15 % grade II).
- Détection de ctDNA dans le CSF :
 - - Positif dans 49,4 % des échantillons.
 - - Corrélation avec progression tumorale ($p = 0,0005$) et charge tumorale élevée ($p = 0,0000017$).
- Concordance avec les biopsies tumorales :
 - - 100 % pour les mutations définissant les sous-types de gliomes.
 - - Médiane de 81,7 % de mutations partagées chez les patients sans hypermutation.

Friedman, Joshua S., Charli Ann J. Hertz, Matthias A. Karajannis, et Alexandra M. Miller. « Tapping into the Genome: The Role of CSF ctDNA Liquid Biopsy in Glioma ». *Neuro-Oncology Advances* 4, n° Suppl 2 (novembre 2022): ii33-40.

Miller, Alexandra M., Ronak H. Shah, Elena I. Pentsova, Maryam Pourmaleki, Samuel Briggs, Natalie Distefano, Youyun Zheng, et al. « Tracking Tumour Evolution in Glioma through Liquid Biopsies of Cerebrospinal Fluid ». *Nature* 565, n° 7741 (janvier 2019): 654-58.



Cancer cérébral

Enfant de 13 ans suivi pour un gliome diffus hémisphérique temporal droit, H3G34 muté, après exérèse complète et radiothérapie focale fin 2023.

Signe de récurrence en novembre 2024 : douleurs d'allure neuropathique de l'hémicorps supérieur gauche.

■ Tissu – décembre 2023

- *TP53*, c.1024C>T, p.(Arg342*) sur l'exon 10, FA 91%
- *PTEN*, c.388C>T, p.(Arg130*) sur l'exon 5, FA 86%
- *H3F3A*, c.103G>A, p.(Gly35Arg) sur l'exon 2, FA 29%
- *PDGFRA*, c.1975A>T, p.(Asn659Tyr) sur l'exon 14, FA 29%

■ Ponction lombaire – novembre 2024

LIQUIDE DE PONCTION CEPHALO-RACHIDIENNE

Prélèvement satisfaisant pour le diagnostic.

Présence de quelques cellules d'aspect atypique, suspectes.

TISSU

LCR



LCR – novembre 2024

***TP53*, c.1024C>T, p.(Arg342*) sur l'exon 10, FA 95%**
***H3F3A*, c.103G>A, p.(Gly35Arg) sur l'exon 2, FA 32%**



Cancer du poumon

Détection des résistances

Patient avec carcinome neuroendocrine et une fusion EML4::NTRK3 – traitement par LAROTRECTINIB débuté fin 2020 puis plusieurs lignes de traitement avec métastases osseuses, hépatiques et cérébrales.

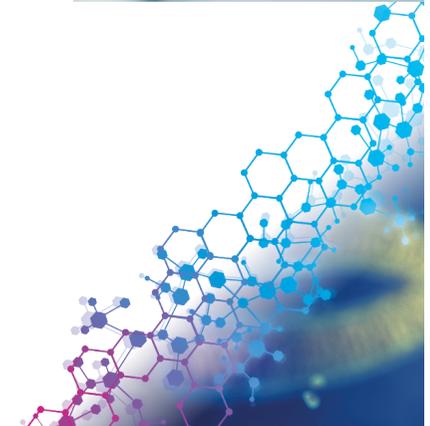
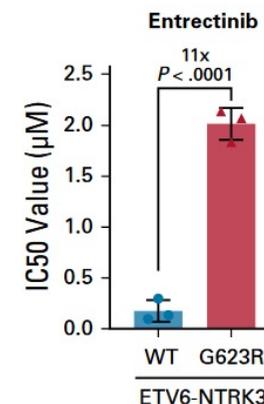
Passage sous Repotrectinib

LCR – progression cérébrale

- Présence d'un variant oncogénique du gène *NTRK3*, c.1867G>A, p.Gly623Arg sur l'exon 16, fréquence allélique à titre indicatif: 49%

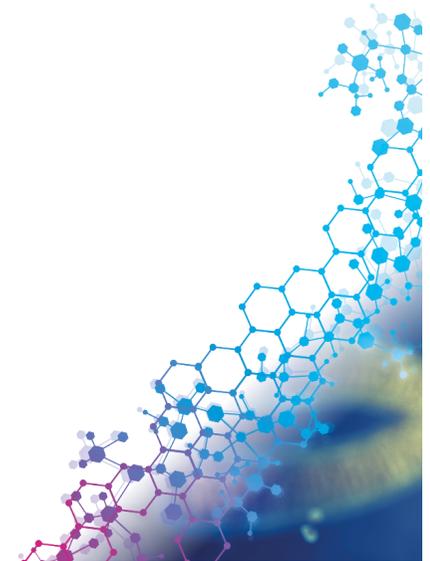
Confirmation sur sang (13%) / tissu (40%)

Hanf, Dorothea, Christoph Heining, Karin Laaber, Heiner Nebelung, Sebastian Uhrig, Barbara Hutter, Arne Jahn, et al. « Response to Cabozantinib Following Acquired Entrectinib Resistance in a Patient With ETV6-NTRK3 Fusion-Positive Carcinoma Harboring the NTRK3G623R Solvent-Front Mutation ». *JCO Precision Oncology*, n° 5 (avril 2021): 687-94.



GR retour d'expérience

- **11 870 analyses entre 2021 et 2024**
 - 110 Ascites
 - 63 LCR
 - 18 Liquide de ponction pleurale
 - Référence : 1334 plasma – 28% positif – 3% NC
- **Cancer de l'ovaire – ascite**
 - 97 analyses : 65% de détection d'au moins un variant / interprétable
 - 20% de cas non contributifs (sWGS / GISCAR / NGS panel)
- **Cancer du poumon – LCR (n=23) – 43% positif – 52% NC**
- **Cancers cérébraux – LCR (n=29) – 10% positifs – 72%NC**



Urine

■ Préanalytique

- Tubes spéciaux
- Tubes secs

■ Avantages

- Facilité de collecte
- Non-dépendance à l'état physique du patient
- Aptitude au suivi longitudinal.

■ Applications

- ADN circulant plasmatique filtré (poumon) : EGFR
- Cancer vésical : FGFR3 et TERT (cancers urologiques)

Exemple : collecteur STRECK URINE

- **Méthodologie :**
 - Échantillons traités avec un conservateur (ratios 5:1 ou 20:1).
 - Analyse des gènes KRAS et β -actin sur 7 jours.
- **Résultats clés :**
 - cfDNA stable pendant 7 jours dans les échantillons traités.

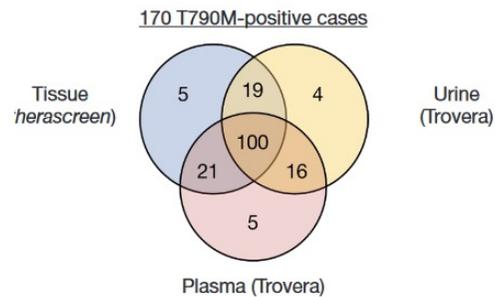


Expérience ?
Pré-analytique
Précautions ?

Urine

■ POUMON

- Sensibilité de 67 à 75 % et une spécificité de 94 à 100 % pour la détection des mutations EGFR.



174 matched tissue, plasma and urine specimens	% T790M positive
Positive by any one specimen type	97.7
Positive by plasma and urine combined	94.8
Negative/invalid by all three specimens	2.3
Positive by tissue	83.3
Positive by plasma	81.6
Positive by urine	79.9



Franovic, Aleksandra, Victoria M. Raymond, Mark G. Erlander, et Karen L. Reckamp. « Urine Test for EGFR Analysis in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer ». *Journal of Thoracic Disease* 9, n° Suppl 13 (octobre 2017): S1323-31.



Urine

•Diagnostic et suivi

Approche informée

utDNA dans 93 % des cas en utilisant une approche informée par la tumeur, avec une spécificité de 96 % à 100%.

84 % sans l'informations sur les mutations tumorales

> tests standards comme la cytologie et le test UroVysion.

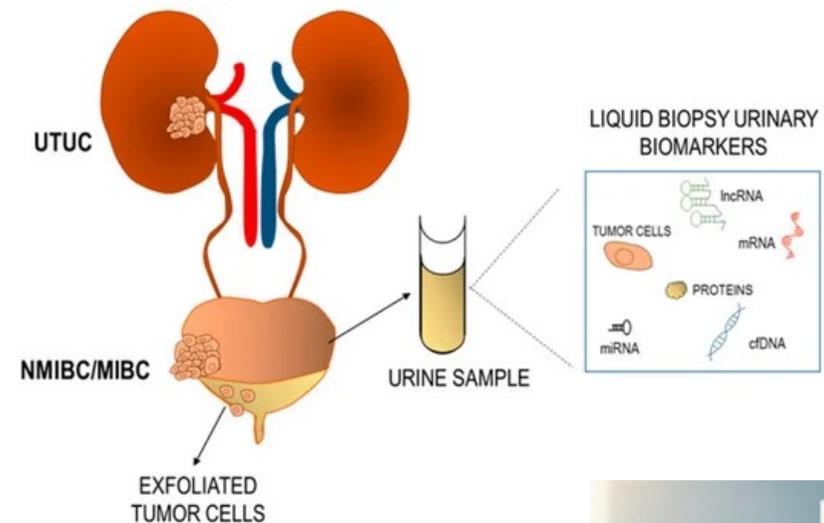
• Surveillance :

Détection de 91 % des récives de cancer, avec une avance médiane de 2,7 mois

• Impact Clinique :

- 100 % des cas positifs par cytologie
- 82 % des cas manqués par celle-ci.

•Impact potentiel : réduction des cystoscopie



Ferro, Matteo, Evelina La Civita, Antonietta Liotti, Michele Cennamo, Fabiana Tortora, Carlo Buonerba, Felice Crocetto, et al. « Liquid Biopsy Biomarkers in Urine: A Route towards Molecular Diagnosis and Personalized Medicine of Bladder Cancer ». *Journal of Personalized Medicine* 11, n° 3 (mars 2021): 237.



- **Évaluation technique dans le cadre de l'étude PROMECI**
- **Contexte de l'étude**
 - Objectif : Évaluer la faisabilité technique de la recherche de variants des gènes de recombinaison homologue (HRR) sur l'ADN tumoral circulant dans les cancers de la prostate métastatiques.
 - Participants : 40 patients.
 - Méthode : Collecte d'urines et de sang lors des consultations, sans traitement pré-analytique particulier pour les urines.



CHU de Tours

Urine

■ Méthodologie et Résultats

- Extraction d'ADN : Kit : Maxwell RSC ccfDNA LV Plasma Kit (Promega).
- Augmentation du volume d'urine extrait : 4 ml → 8 ml pour accroître la quantité d'ADN (médiane initiale : 0.3 ng/μL).

■ Préparation des bibliothèques

- Kit : PCR ancrée Qiagen, adapté à l'ADN circulant.

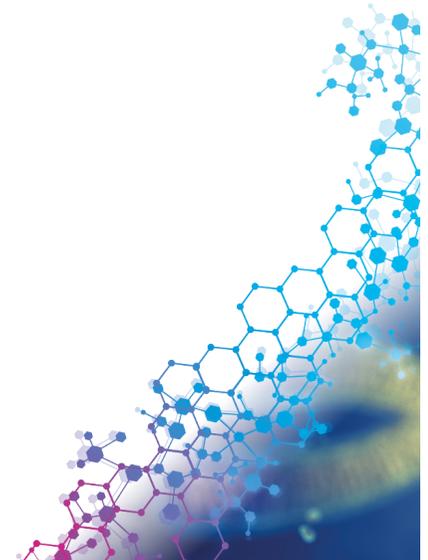
■ Résultats :

■ Dosage Qubit moyen : 12.4 ng/μL (correct).

- Reads UMI insuffisants (<100), rendant les résultats non exploitables.

■ Axes d'amélioration

- Récupération des premières mictions du matin.
- Utilisation de tubes spécifiques : Urine Collection and Preservation Devices (Norgen Biotek Corp).



Lavage LBA

- **Préanalytique**
 - Post lavage
 - Tubes sec
- **Applications**
 - Cancer du poumon



Expérience ?
Pré-analytique
Précautions ?



Séquençage liquides hors plasma à l'ICO, 2019-2024

73 liquides : 56 liquides péritonéaux, 16 LCR, 1 ascite

71 poumons						
56 liquides pleuraux			14 LCR			1 ascite
32 WT	23 mutés	1 NI	4 WT	8 mutés	2 NI	1 muté
	14 EGFR			7 EGFR		1 EGFR
	3 BRAF			1 BRAF		
	2 MET					
	2 KRAS					
	1 EGFR+MET					
	1 NRAS					

2 mélanomes

2 LCR WT

Dr Christophe PASSOT
 ICO



Autres liquides

- **Liquide séminal – cancer de la prostate**

Ponti, Giovanni, Monia Maccaferri, Salvatore Micali, Marco Manfredini, Riccardo Milandri, Giampaolo Bianchi, Giovanni Pellacani, et al. "Seminal Cell Free DNA Concentration Levels Discriminate Between Prostate Cancer and Benign Prostatic Hyperplasia." *Anticancer Research* 38, no. 9 (September 2018): 5121–25

- **Bile - cancers biliaires/pancréatiques**

Miura, Yoshifumi, Hiroshi Ohyama, Rintaro Mikata, Yosuke Hirotsu, Kenji Amemiya, Hitoshi Mochizuki, Junichiro Ikeda, Masayuki Ohtsuka, Naoya Kato, et Masao Omata. « The Efficacy of Bile Liquid Biopsy in the Diagnosis and Treatment of Biliary Tract Cancer ». *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences* 31, no 5 (2024): 329-38.

- **Salive - cancers de la tête et du cou....**

Patel, Aditi, Shanaya Patel, Parina Patel, et Vivek Tanavde. « Saliva Based Liquid Biopsies in Head and Neck Cancer: How Far Are We From the Clinic? » *Frontiers in Oncology* 12 (21 mars 2022).

