

JOURNÉES DU
GFCO 10^e ÉDITION

Biomarqueurs et analyses moléculaires en oncologie

Avec la participation
scientifique du



SESSION NOUVELLES TECHNOLOGIES

Avec la participation
scientifique du



Approches de séquençage de 3^{ème} génération

Romain Boidot, Dijon

Avec la participation
scientifique du



LIENS D'INTÉRÊT

- *Présentations, boards, conseil*

AstraZeneca, MSD, GSK, Myriad Genetics, SeqOne Genomics, Brenus Pharma, Clinisciences, Menarini Stemline, Owkin

- *Participations conférences*

Oxford Nanopore Technologies, New England Biolabs, Agilent Technologies, SeqOne Genomics

- *Financements projet de recherche*

Oxford Nanopore Technologies, AstraZeneca



Introduction

- Depuis plus de 10 ans, plusieurs révolutions technologiques en séquençage
- Séquenceurs NGS ont révolutionné les connaissances et la prise en charge des patients
- Vrai dans tous les domaines et notamment en oncologie
- D'abord en constitutionnel puis en somatique
- Le séquençage de 3^{ème} génération suit le même chemin...

La 3^{ème} génération...

- **Séquençage de 3^{ème} génération**
 - Long read
 - PacBio
 - ONT

- **Outils moléculaires de 3^{ème} génération**
 - Bionano

La 3^{ème} génération...

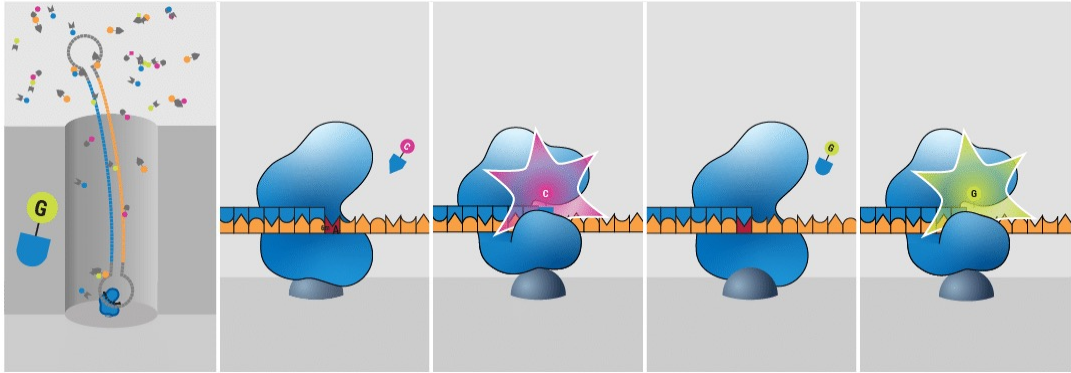
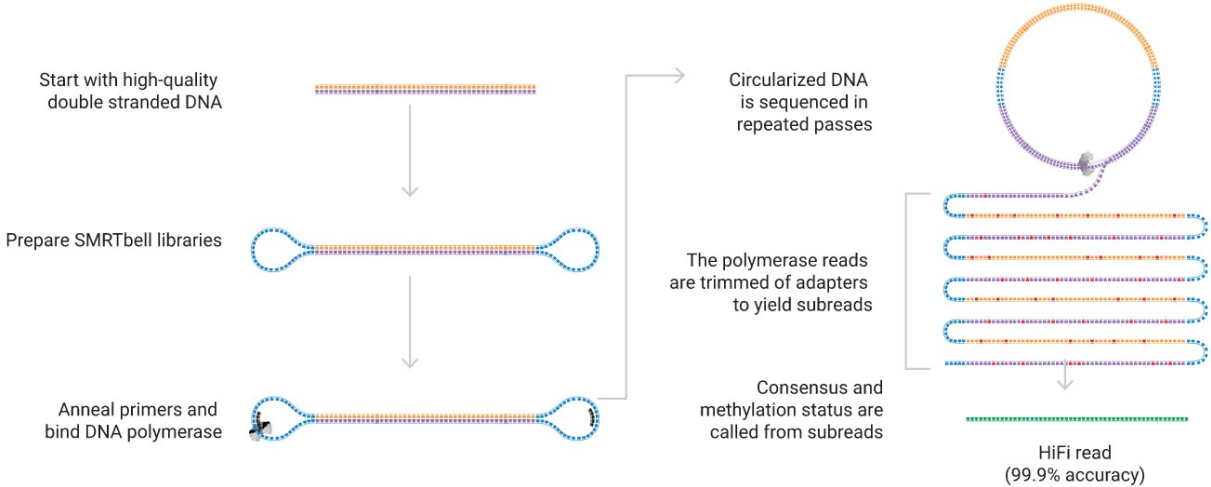
- Séquençage de 3^{ème} génération ou séquençage long read

	PacBio	ONT
Longueur de lecture	1 – 20 000	20 – 100 000
Exactitude de lecture	Q30	Q20
Temps de run	24h	Jusqu'à 72h
SNV	✓	✓
Indel	✓	✓
SV	✓	✓
Méthylation	✓	✓
ADN natif	✓	✓
ARN natif	✓	✓
Phasing	✓	✓

Site internet PacBio (<https://www.pacb.com/>) et Oxford Nanopore Technologies (<https://nanoporetech.com/>)

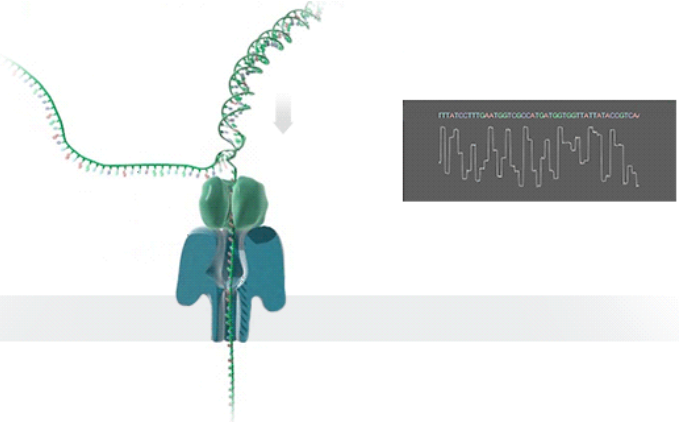
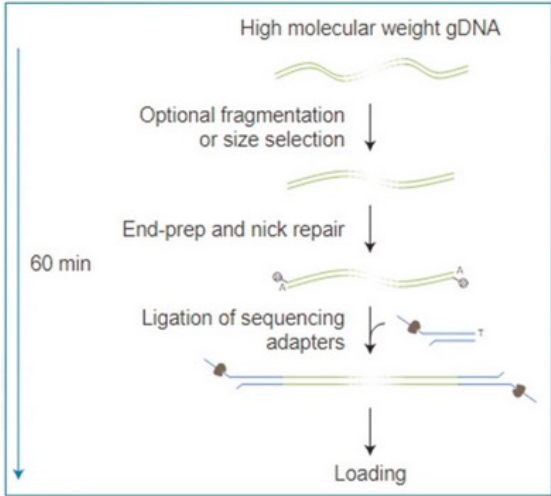
Long read...

■ PacBio



Long read...

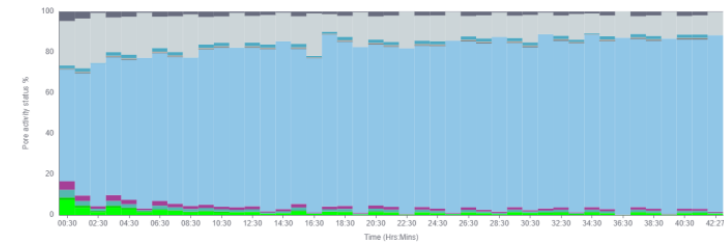
- **ONT**



Site internet ONT

Echantillons tumoraux FFPE

■ Pas pour la FFPE native

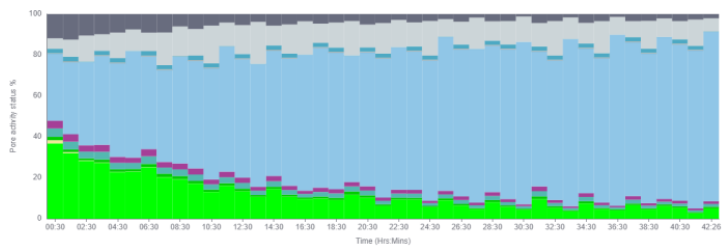


DATA OUTPUT

Estimated bases	Data produced
75.61 Mb	1.04 GB
Reads generated	Estimated N50
19.09 k	380

BASECALLING

Reads called	Bases called (min Q score: 9)	
99.95%	1.76 Mb (Pass)	31.9 Mb (Fail)

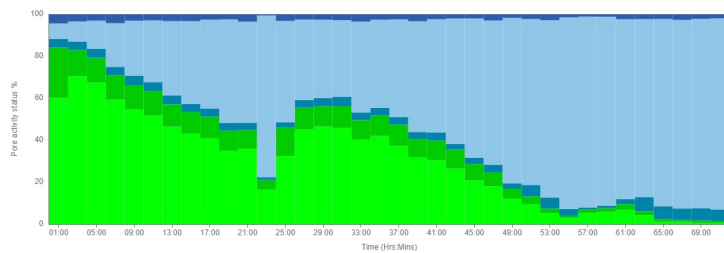


DATA OUTPUT

Estimated bases	Data produced
1.1 Gb	16.21 GB
Reads generated	Estimated N50
544 k	1.08 kb

BASECALLING

Reads called	Bases called (min Q score: 9)	
100%	327.17 Mb (Pass)	408.25 Mb (Fail)



DATA OUTPUT

Estimated bases	Reads generated
14.1 Gb	2.85 M
Estimated N50	Total data produced (pass / fail)
6.82 kb	170.91 GB

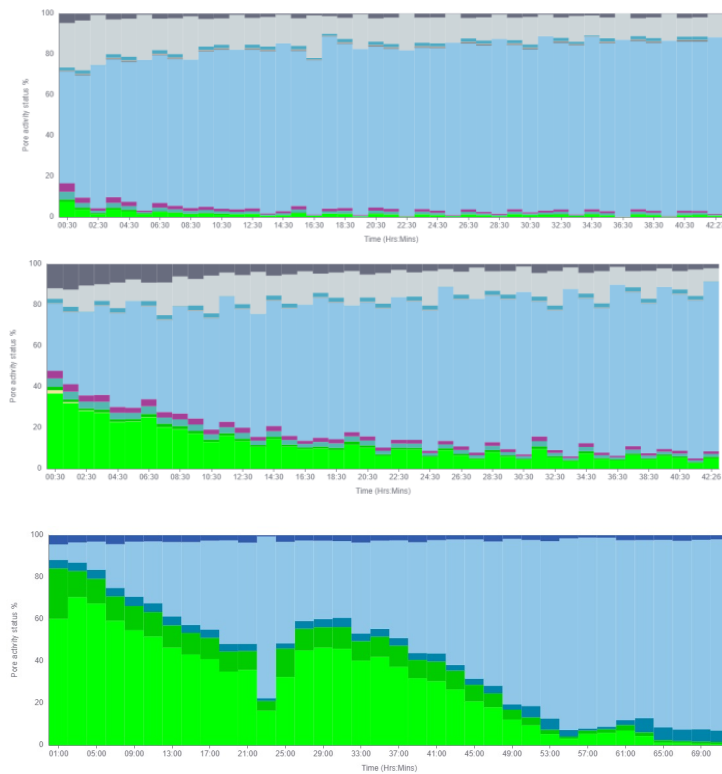
BASECALLING

Reads called	Bases called (min Q score: 9)	
100%	9.92 Gb (Pass)	4.61 Gb (Fail)

FFPE

Echantillons tumoraux FFPE

■ Pas pour la FFPE native



DATA OUTPUT

Estimated bases	Data produced
75.61 Mb	1.04 GB
Reads generated	Estimated N50
19.09 k	380

BASECALLING

Reads called	Bases called (min Q score: 9)	
99.95%	1.76 Mb	31.9 Mb
	Pass	Fail

DATA OUTPUT

Estimated bases	Data produced
1.1 Gb	16.21 GB
Reads generated	Estimated N50
544 k	1.08 kb

BASECALLING

Reads called	Bases called (min Q score: 9)	
100%	327.17 Mb	408.25 Mb
	Pass	Fail

DATA OUTPUT

Estimated bases	Reads generated
14.1 Gb	2.85 M
Estimated N50	Total data produced (pass / fail)
6.82 kb	170.91 GB

BASECALLING

Reads called	Bases called (min Q score: 9)	
100%	9.92 Gb	4.61 Gb
	Pass	Fail

FFPE

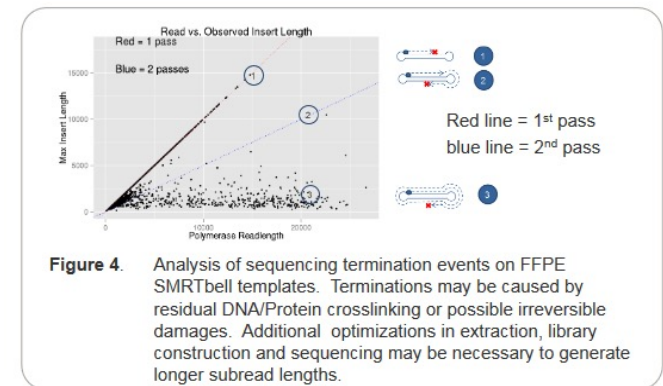


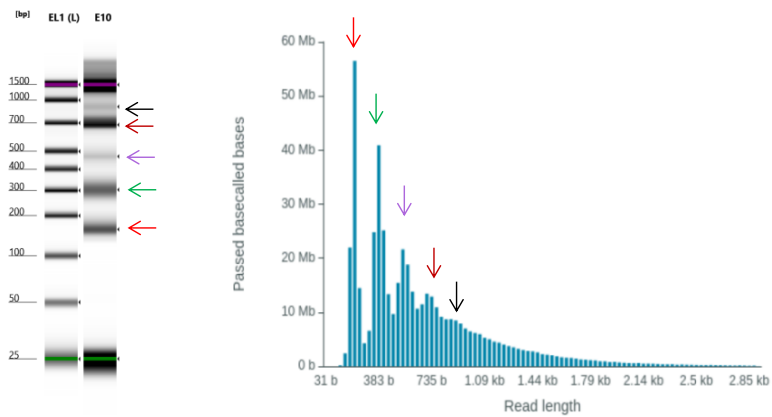
Figure 4. Analysis of sequencing termination events on FFPE SMRTbell templates. Terminations may be caused by residual DNA/Protein crosslinking or possible irreversible damages. Additional optimizations in extraction, library construction and sequencing may be necessary to generate longer subread lengths.

PacBio SMRT® Sequencing of DNA and RNA Samples Extracted from Formalin-Fixed and Paraffin Embedded Tissues Using Adaptive Focused Acoustics by Covaris

Primo Baybayan¹, Michael Weiland¹, Kevin Eng¹, Guillaume Durin¹, Brian Packard¹, Anand Sethuraman¹, Lawrence Hon¹ and Steve Kujawa¹
Pacific Biosciences, 1380 Willow Road, Menlo Park, CA 94025. ¹Covaris Inc., Woburn, Massachusetts 01801

Détection de la MRD

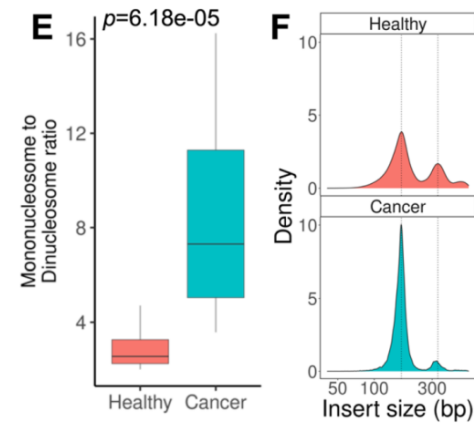
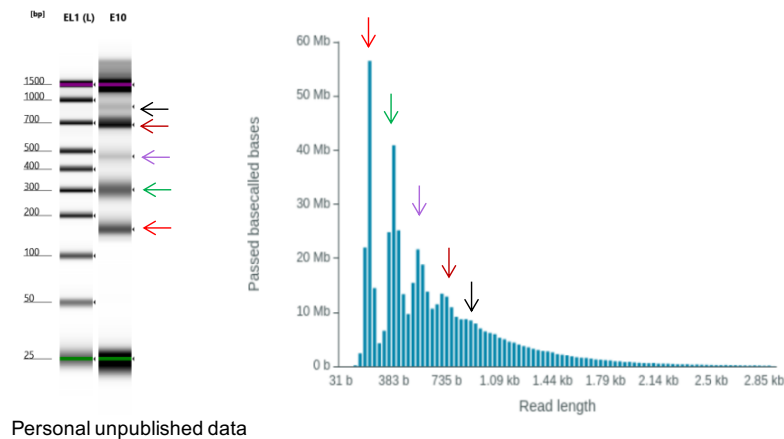
- Détection des différentes tailles d'ADN circulant



Personal unpublished data

Détection de la MRD

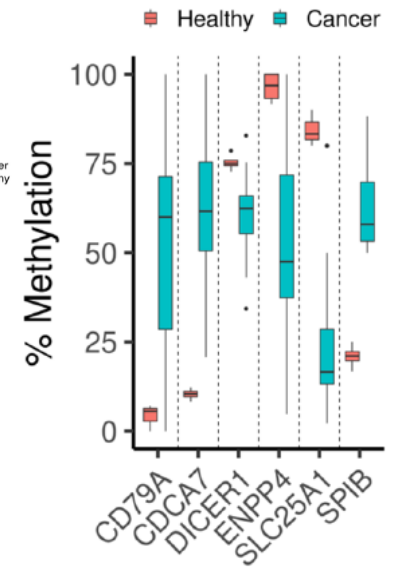
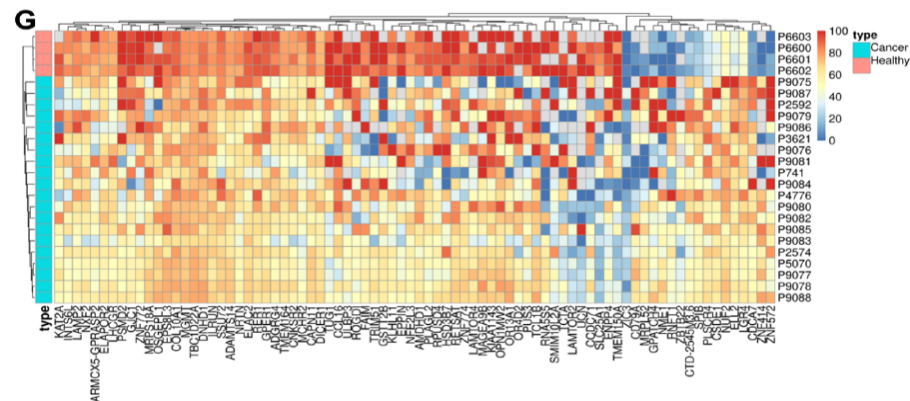
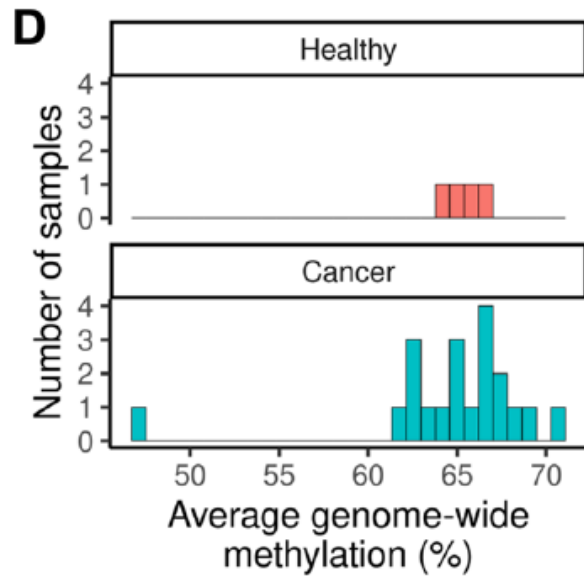
- Détection des différentes tailles d'ADN circulant / fragmentation



Lau *et al.*, 2023 – *Gen Med*

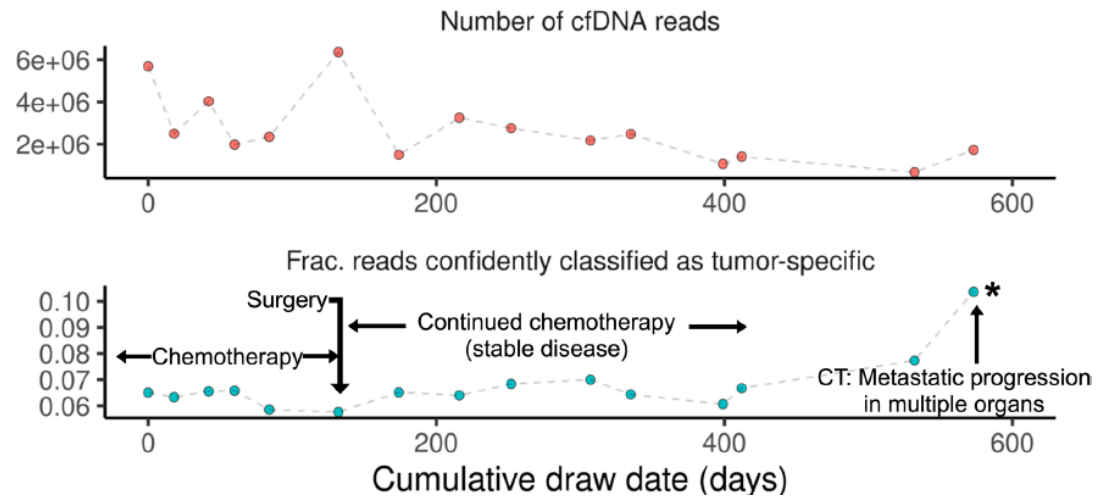
Détection de la MRD

■ Détection de la méthylation de l'ADN



Détection de la MRD

■ Détection de la méthylation de l'ADN (colon)

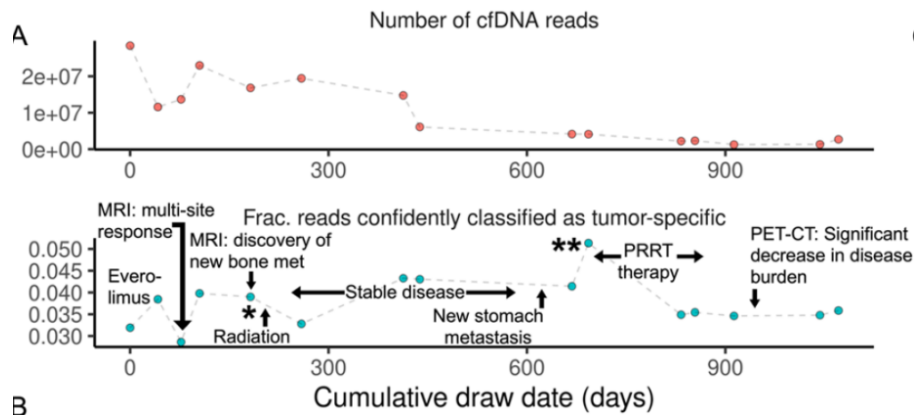


Lau et al., 2023 – Gen Med

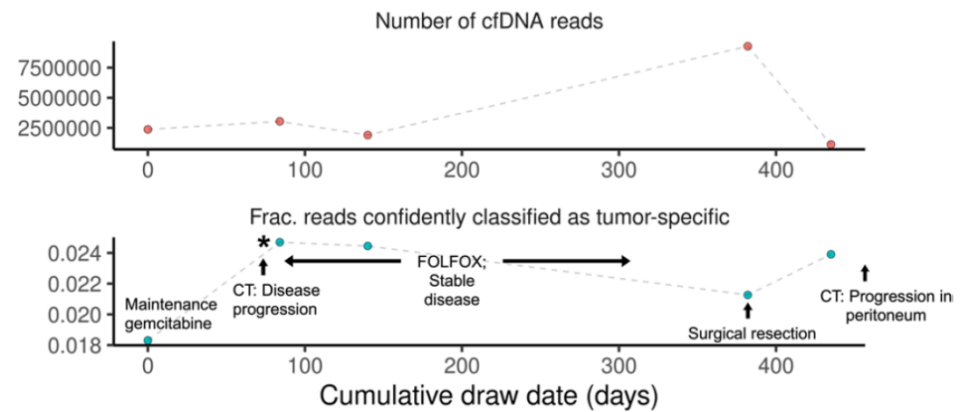
Détection de la MRD

■ Détection de la méthylation de l'ADN

P4822 – Metastatic pancreatic neuroendocrine carcinoma



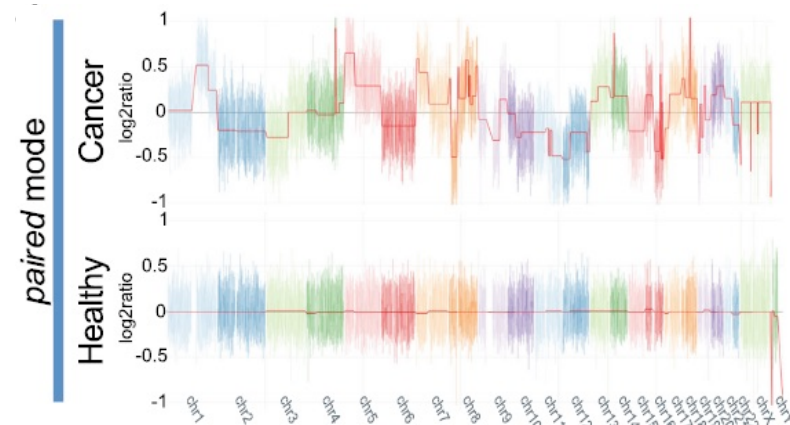
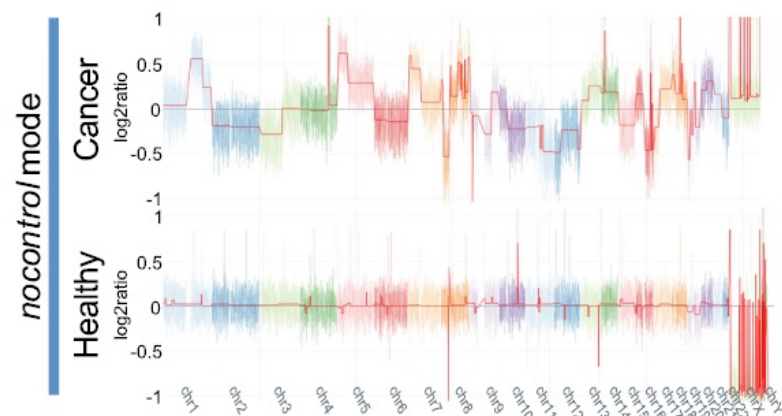
P6527 – Intrahepatic cholangiocarcinoma



Lau et al., 2023 – Gen Med

Détection de la MRD

- Détection des CNV de l'ADN circulant (poumon)



Martignano *et al.*, 2021 – *Mol Cancer*

La 3^{ème} génération...

- **Séquençage de 3^{ème} génération**
 - Long read
 - PacBio
 - ONT

- **Outils moléculaires de 3^{ème} génération**
 - Bionano

La 3^{ème} génération...

■ Outils moléculaires de 3^{ème} génération

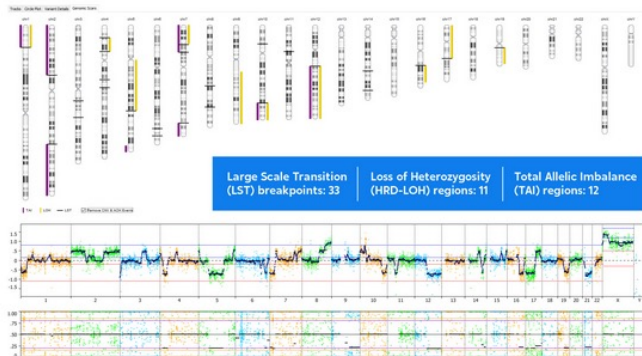
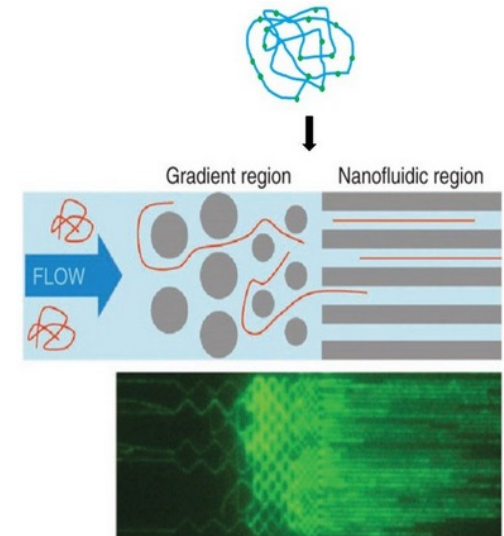
■ Bionano / peignage moléculaire

-  Fresh and Frozen Cell Lines
-  Fresh and Frozen Blood
-  Fresh and Frozen Bone Marrow Aspirate
-  Fresh and Frozen Tissue and Tumor



Product	SP-G2	DLS-G2	G3.3 Chip	Saphyr	Compute/Access
Application Type <small>Raw coverage / Effective coverage goals</small>	ISOLATION	LABELING	LOADING	IMAGING	ANALYSIS
Constitutional 400 Gbp / 80x	3.5 – 4.5 hours	5 – 5.5 hours	1 hour	5.5 – 7.5 hours	12 - 16 hours
Constitutional 800 Gbp / 160x	3.5 – 4.5 hours	5 – 5.5 hours	1 hour	10 – 14 hours	12 - 16 hours
Cancer (Blood/Cell) 1500 Gbp / 300x	3.5 – 4.5 hours	5 – 5.5 hours	1 hour	17 – 26 hours	8 hours
Cancer (BMA) 1500 Gbp / 300x	4 – 5 hours	5 – 5.5 hours	1 hour	24 – 34 hours	8 hours

40 Gbp per scan in Constitutional (400 Gbp and 800 Gbp) and Cancer (Blood/Cell)
30 Gbp per scan in BMA (1500 Gbp)



Genomic Scars	
Minimum LST event size:	10.0 Mb
Minimum LST gap size:	3.0 Mb
Minimum LOH event size:	15.0 Mb
Minimum LOH gap size:	3.0 Mb
Minimum TAI event size:	3.0 Mb
Minimum TAI gap size:	3.0 Mb
Large Scale Transition (LST) breakpoints:	20
Loss of Heterozygosity (HRD-LOH) regions:	11
Total Allelic Imbalance (TAI) regions:	5

Site internet Bionano
Site France Génomique

En synthèse, les outils de 3^{ème} génération

- Adaptés aux acides nucléiques de très bonne qualité
- Séquenceurs ont plus d'avenir que le peignage moléculaire
- Apportent de nouvelles informations complémentaires au séquençage de 2^{nde} génération
- Seront des outils indispensables à la pratique clinique dans quelques années, mais en complément et non en remplacement de nos outils actuels

CRISPR pour le Diagnostic Moléculaire en oncologie : Potentiel et Perspectives

Samuel Amintas - MCU-PH

Service de Biologie des Tumeurs et Tumorothèque

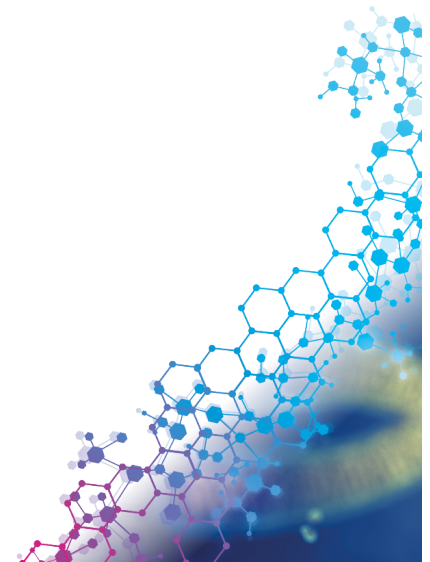
CHU de Bordeaux

Avec la participation
scientifique du



LIENS D'INTÉRÊT

- Astra Zeneca, Incyte, BioRad



En l'an 12 après CRISPR



- **CRISPR** : *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*
 - **CRISPR Cas9** : Découverte / publication princeps en 2012 / Prix Nobel de Chimie 2020 (Charpentier / Doudna)
 - Origine bactérienne / Système de défense ciblant les bactériophages
 - **Outil majeur pour l'édition génétique** => Modélisation de variants, inactivation de gènes, banques de screening....
 - Premières **thérapies géniques CRISPR/Cas9** déjà sur le marché

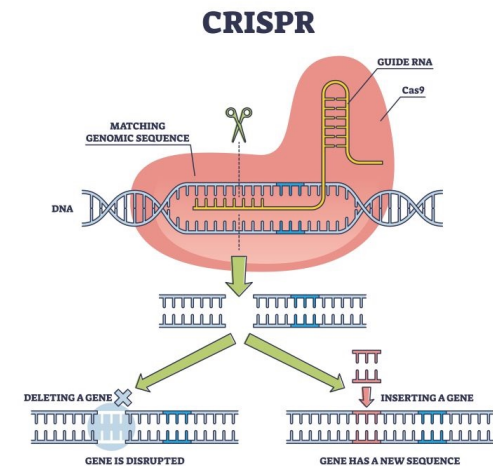
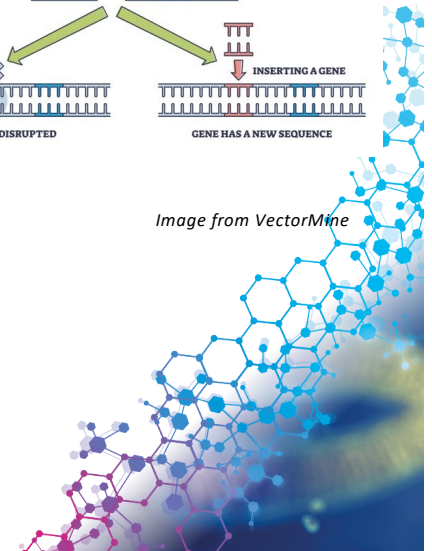
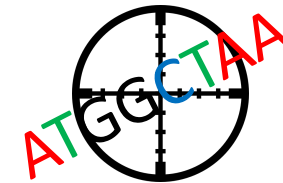


Image from VectorMine



CRISPR et Diagnostic Moléculaire

- **Capacité à cibler une séquence nucléotidique spécifique via un guide ARN**
⇒ **Outil moléculaire pour la détection de séquences cibles**



- **Différents domaines d'application :**

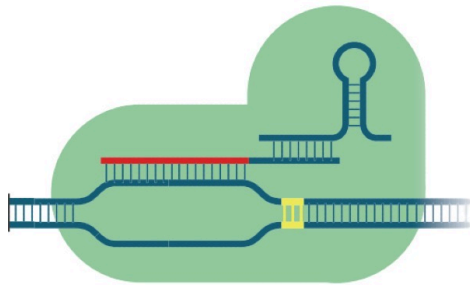
- **Infectiologie** : Détection de génomes viraux et bactériens, typage de souche...
- **Oncologie** : Détection d'altérations génétiques somatiques, de biomarqueurs tumoraux

- ⇒ **Applications en biopsie liquide** : **ctDNA**, CTCs, vésicules extracellulaires...



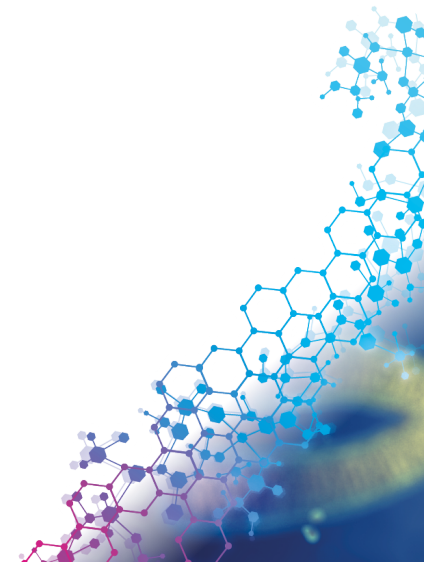
CRISPR/Cas

Cas 9



- Endonucléase **ADN double-brin (blunt)**
- Nécessité d'une séquence **PAM** (NGG) en amont du site de coupure
- ARN guide ~100nt /
Séquence **spacer** 18-24nt

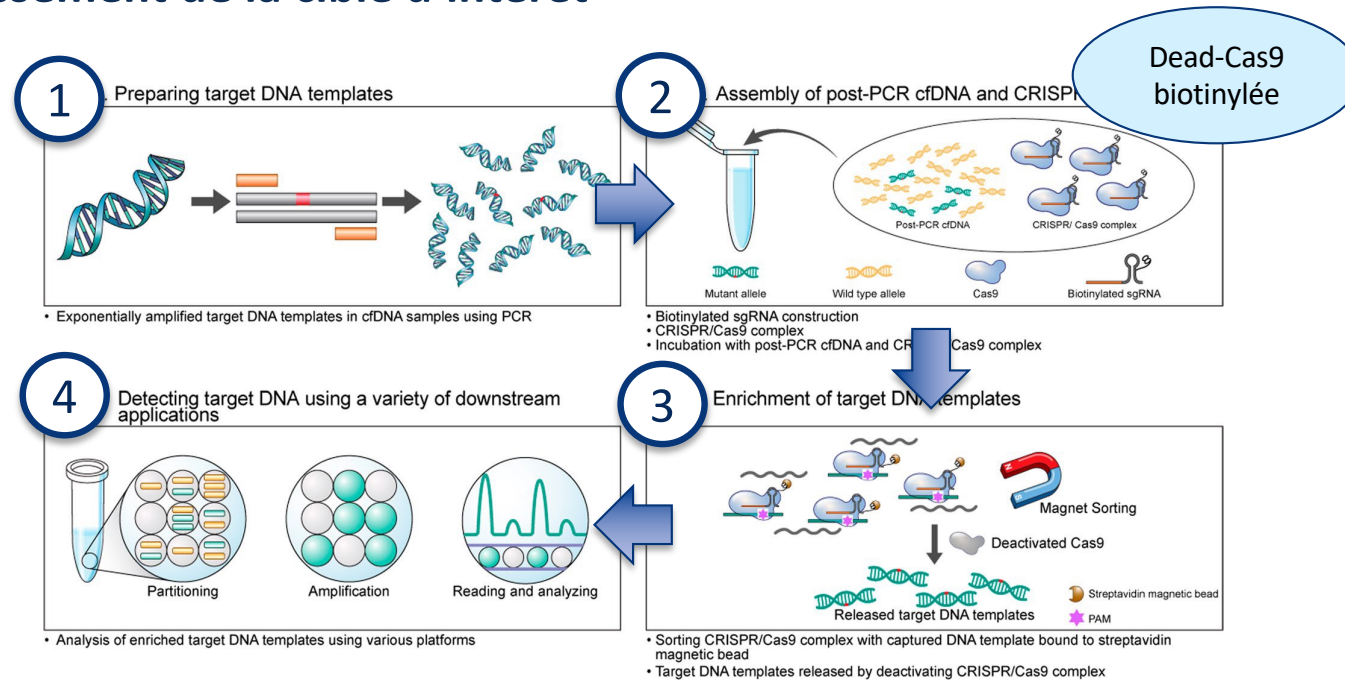
Images from Cell editor



CRISPR et Diagnostic en oncologie

■ Cas9 : Enrichissement de la cible d'intérêt

■ EGFR T790M



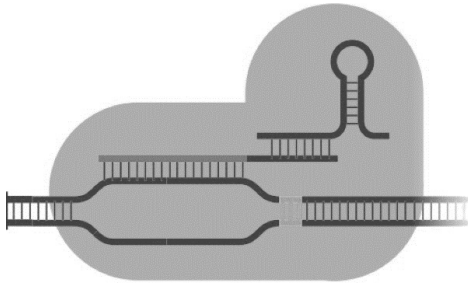
Test sur 60 plasma patients :

- Gain de sensibilité majeur (48% vs 93%)
- Pas de perte de spécificité (96% vs 100%)

Kim et al. Application of CRISPR/Cas9-based mutant enrichment technique to improve the clinical sensitivity of plasma EGFR testing in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Cell Int* 2022

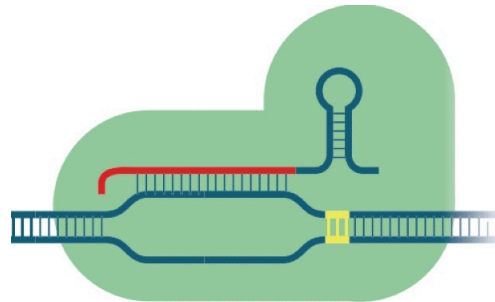
Une Cas peut en cacher deux autres

Cas 9



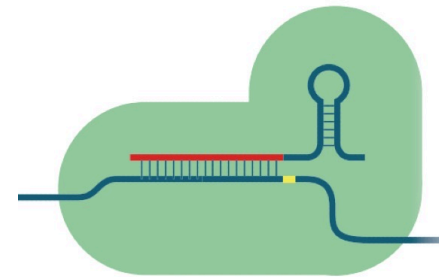
- Endonucléase **ADN double-brin (blunt)**
- Nécessité d'une séquence **PAM** (NGG) en amont du cite de coupure
- ARN guide ~100nt / Séquence spacer 18-24nt

Cas 12



- Endonucléase **ADN double-brin**
- Nécessité d'une séquence **PAM** en amont du cite de coupure
- ARN guide ~ 44nt / Séquence **spacer** 18-25nt

Cas 13



- Endonucléase **ARN**
- Pas forcément besoin de séquence **PAM**
- ARN guide ~ 55nt / Séquence **spacer** 22-30nt

Activité de clivage collatéral non-spécifique



Nouvelles Cas, nouveaux outils

- Clivage de **tous les ADN/ARN à portée de l'enzyme**, indépendamment de leur séquence

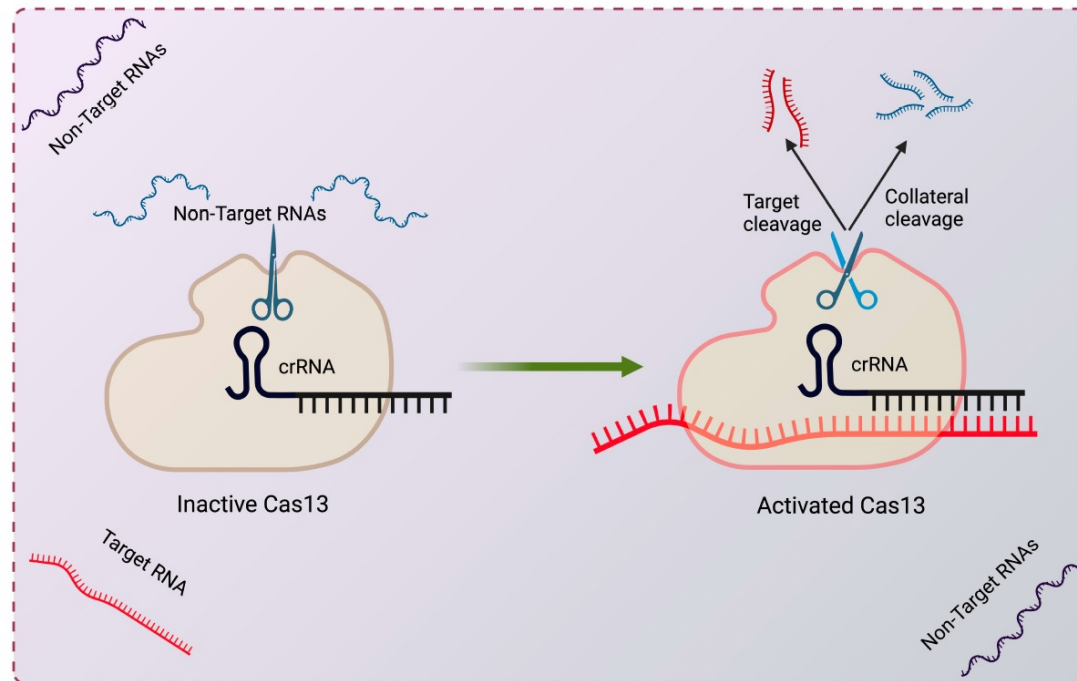
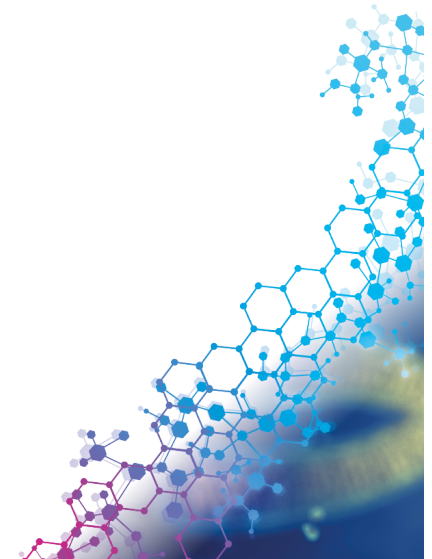


Image from Shi, Peiguo & Wu., Programmable RNA targeting with CRISPR-Cas13. RNA Biology. 2024.



Nouvelles Cas, nouveaux outils

■ Développement de **systèmes rapporteurs fluorescents**

SHERLOCK : Cas13

Gootenberg et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 2017



DETECTR: Cas12

Chen et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*. 2018



HOLMES: Cas12

Li et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. *Cell Discov*. 2018



Les publications princeps mettent en avant des **sensibilités très importantes** en plus d'un temps, d'un équipement, et d'un cout réduit.

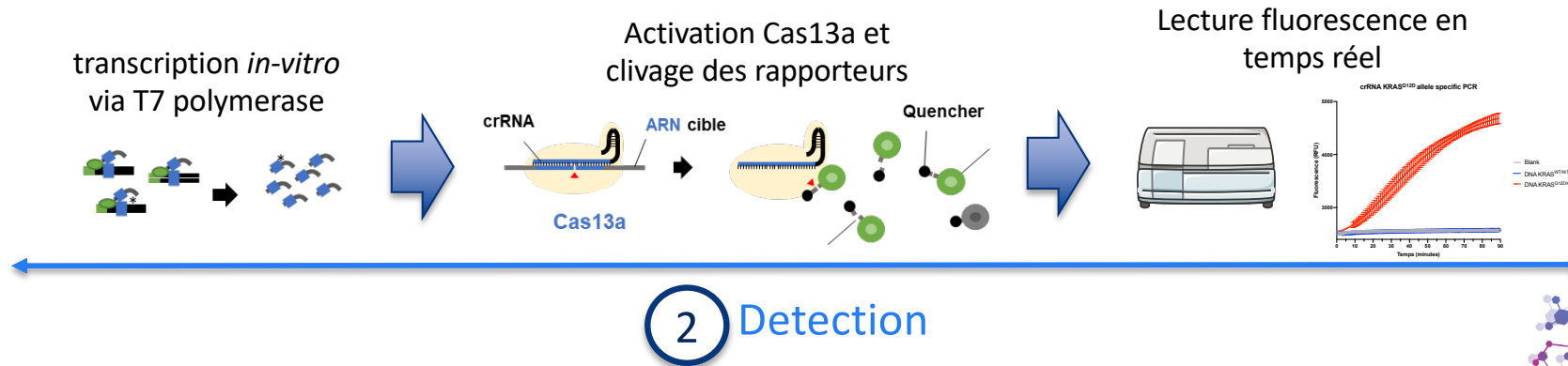
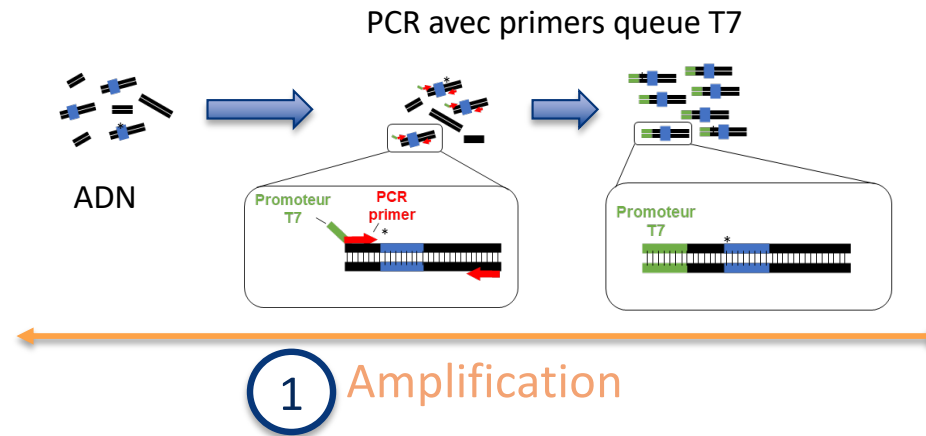
Mais application à l'infectiologie majoritairement

Quid de l'oncologie moléculaire ??



CRISPR et Diagnostic moléculaire en oncologie

- **CRISPR Cas13 :**
EGFR del19
(c.2236_2250del)

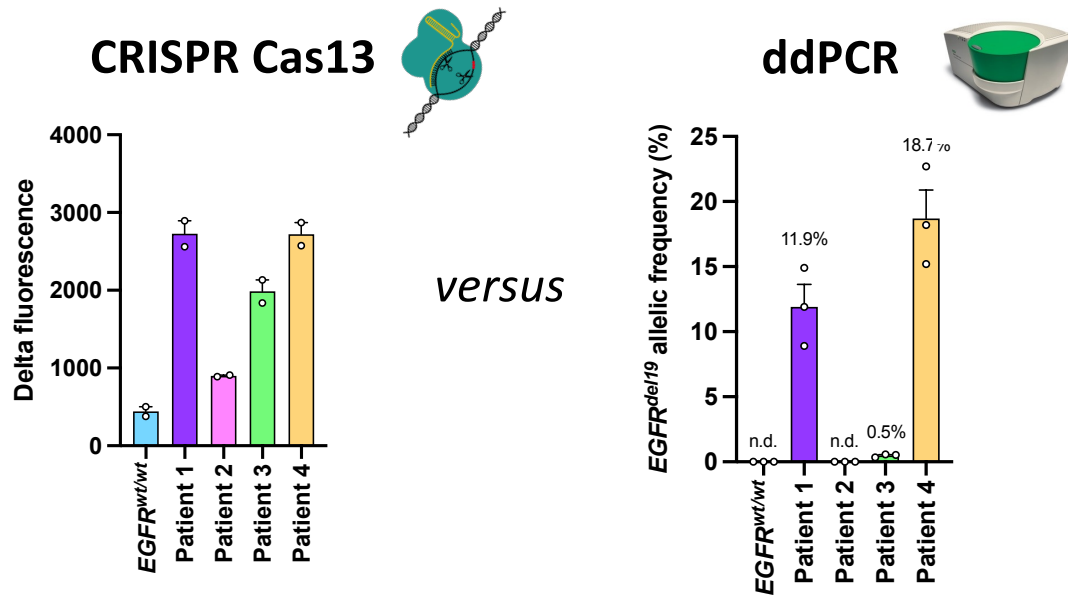


CRISPR et Diagnostic moléculaire en oncologie

■ CRISPR Cas13 : EGFR del19 (c.2236_2250del)

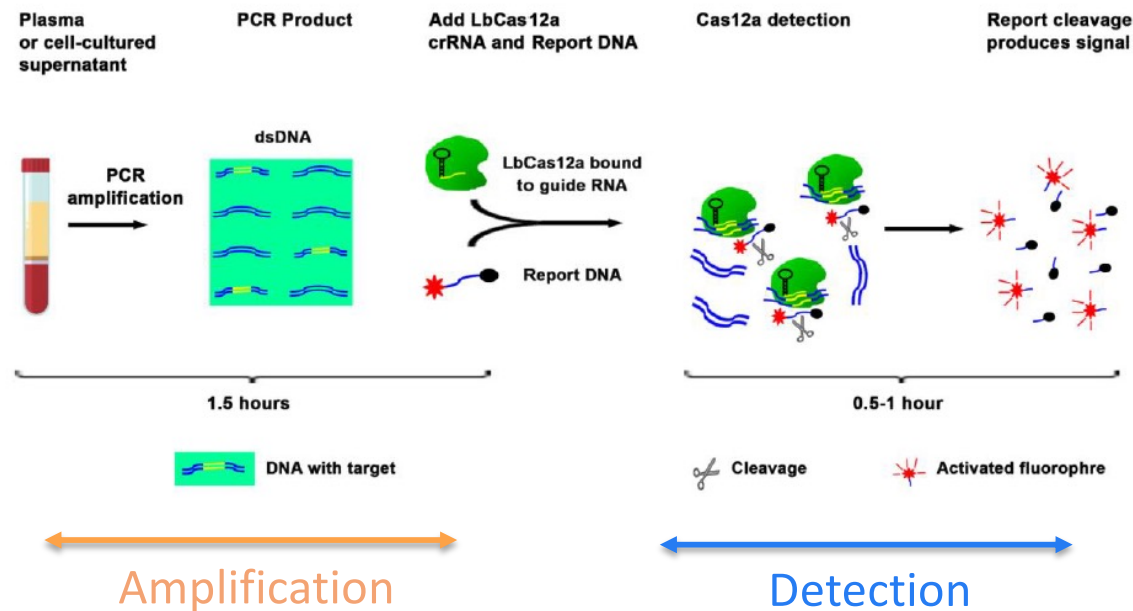
- Echantillons patients / N=4
échantillons plasma patients
avec del 19 positives en Cobas
(Input ADN 10ng)

*Preuve de concept,
mais optimisations nécessaires*



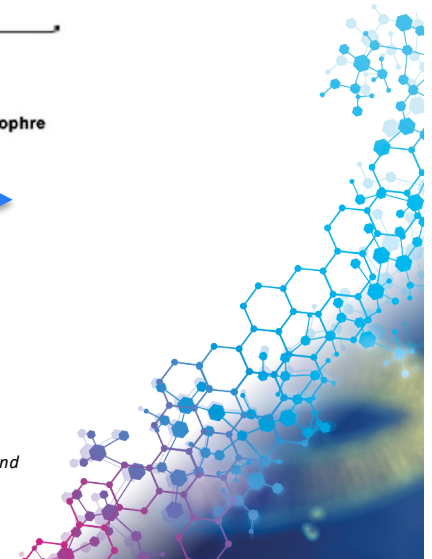
CRISPR et Diagnostic moléculaire en oncologie

■ CRISPR Cas12 : Mutations EGFR L858R et T790M



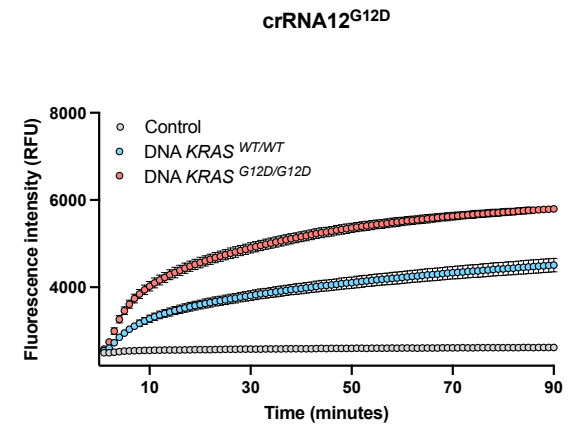
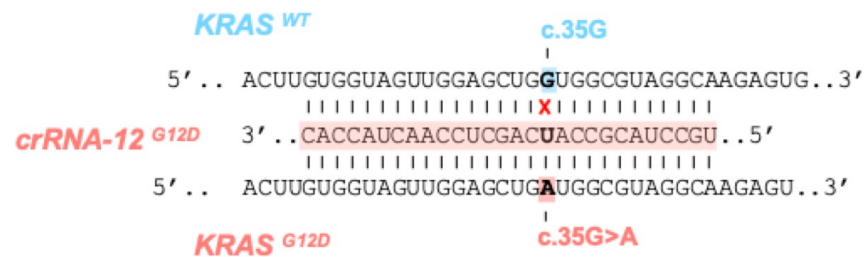
- Sensibilité supérieure à celle de la ddPCR (X10 => 0,005% vs 0,05%)
- Temps d'expérimentation et coût réactif / automate réduit
- Pas testé sur matériel humain (lignées)

Tsou et al. A CRISPR Test for Rapidly and Sensitive Detecting Circulating EGFR Mutations. *Diagnostics (Basel)*. 2020

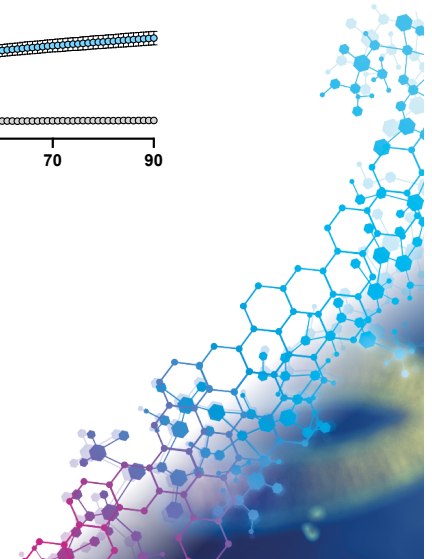


CRISPR et Diagnostic moléculaire en oncologie

■ CRISPR Cas13 : KRAS G12D



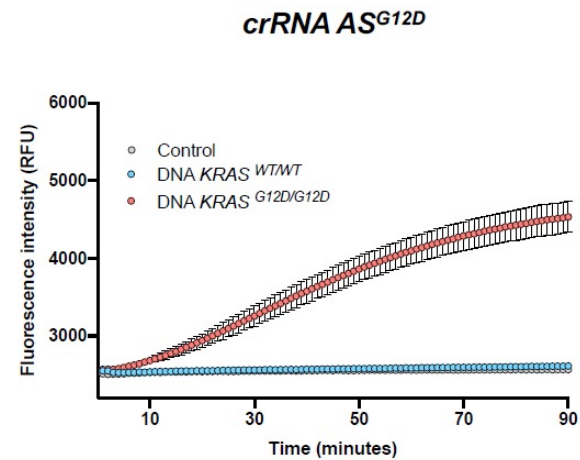
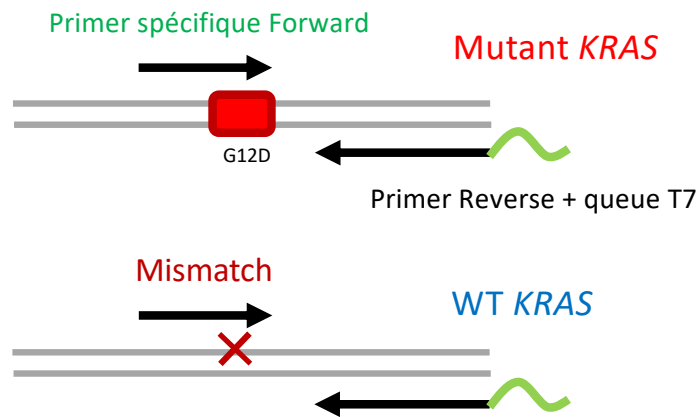
Mauvaise spécificité du guide ARN pour les mutations ponctuelles



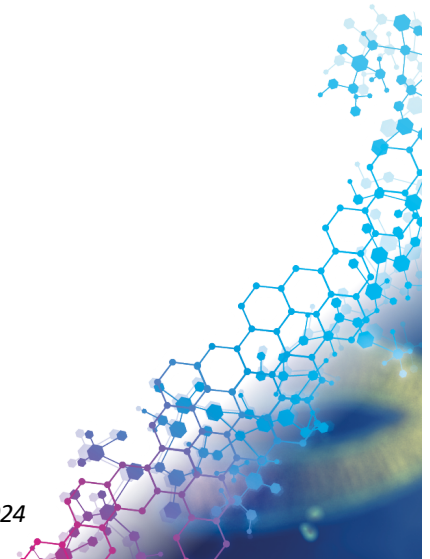
CRISPR et Diagnostic moléculaire en oncologie

■ CRISPR Cas13 : KRAS G12D

- Combiner la spécificité de la PCR et une amplification du signal par CRISPR Cas13



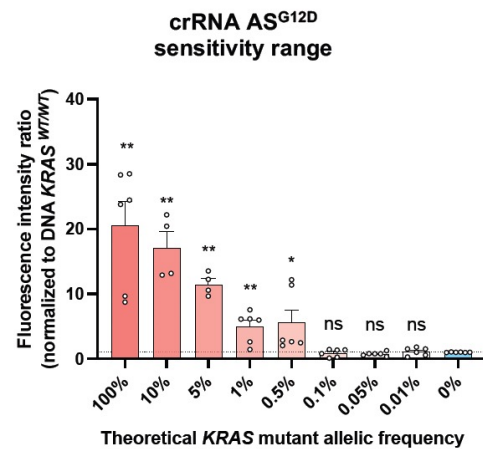
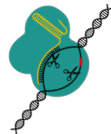
Plus de bruit de fond de la séquence sauvage



CRISPR et Diagnostic moléculaire en oncologie

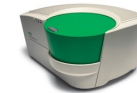
■ CRISPR Cas13 : KRAS G12D

CRISPR Cas13

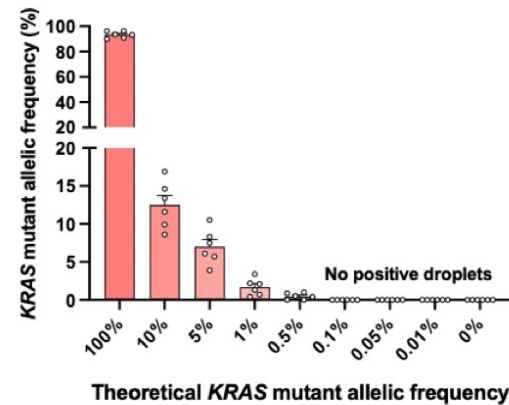


versus

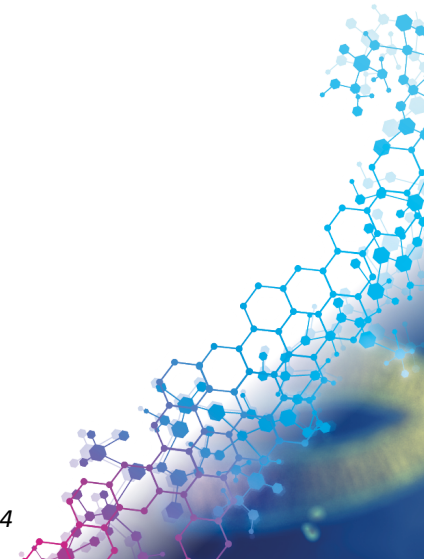
ddPCR



KRAS^{MUT} ddPCR - sensitivity range



Sensibilité équivalente à la ddPCR (DNA input 10ng)

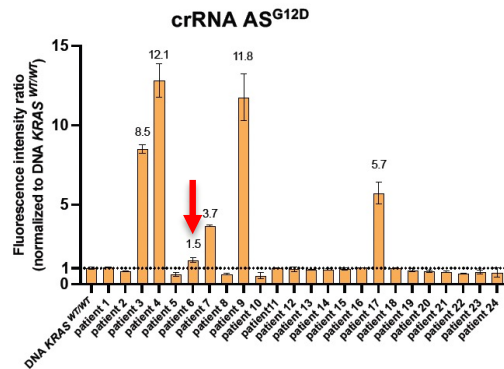
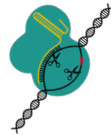


CRISPR et Diagnostic moléculaire en oncologie

■ CRISPR Cas13 : KRAS G12D

- Echantillons patients / n=24 liquides de rinçage de ponction pancréatique

CRISPR Cas13

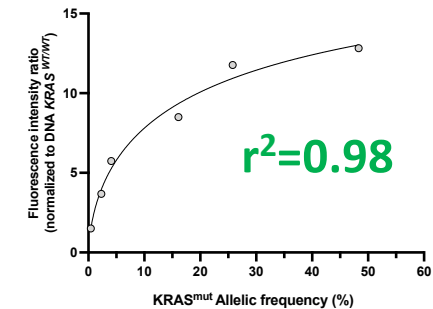
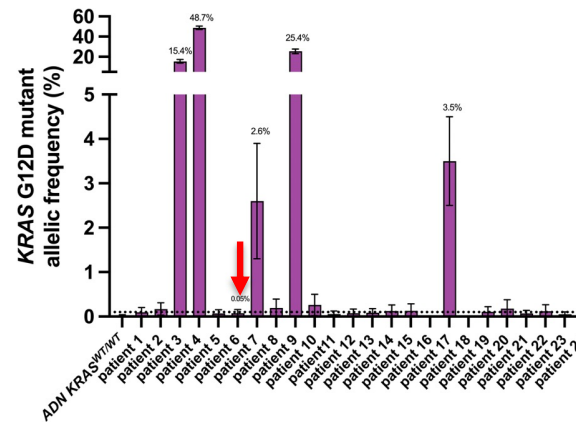


versus

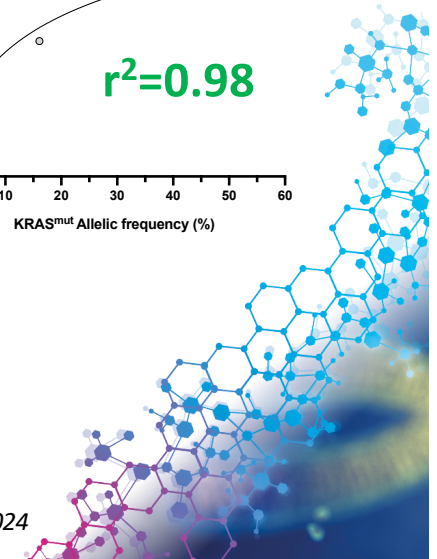
ddPCR



ddPCR specific KRAS^{G12D}

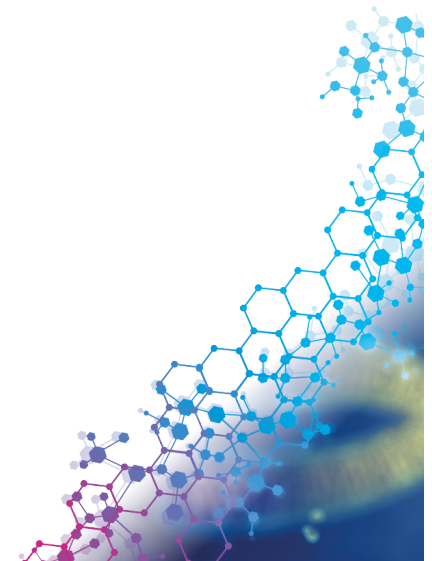
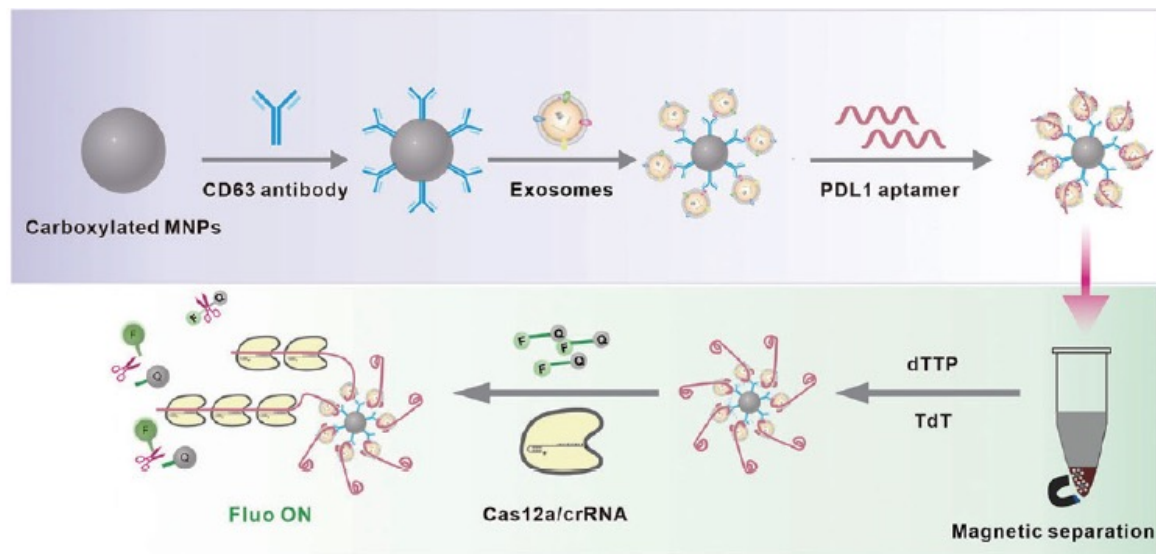


- 23/24 échantillons concordants
- 1 échantillon positif en CRISPR et négatif en ddPCR => Positif en ddPCR avec 50ng d'input ADN
- Très bonne corrélation entre intensité de fluorescence et fréquence allélique



CRISPR et Diagnostic moléculaire en oncologie

- **Biopsie liquide : CTCs et vésicules extracellulaires / exosomes**
 - Développement de nombreux outils pour la détection de **marqueurs de surface** « tumoraux »
 - Combinaison d'une étape de reconnaissance de la cible (via anticorps ou aptamère) et amplification du signal via CRISPR Cas12/13



En synthèse

- Système **flexible** et **facilement adaptable** avec un cout réactifs et automate minimal pour certains systèmes (One-step possible si RPA)
- **L'amplification du signal** (via l'activité de clivage collatéral) représente l'atout majeur du système => **Permet d'augmenter la sensibilité** (si procédé de reconnaissance associé spécifique)
- Le crRNA est très spécifique sur des **séquences exogènes** (génomés viraux) ou **uniques** (fusion génique, large délétion) mais pas pour les altérations ponctuelles (SNV) => Guidelines de design nécessaires
- **Applications déjà en routine** pour l'infectiologie (tests rapides)
- Pas encore en oncologie moléculaire mais nombreux développements en cours... Stay tuned !

MERCI DE VOTRE ATTENTION

Avec la participation
scientifique du

