

Thèse de Doctorat

Jean-Sébastien FRENEL

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : *Biologie-Santé UBL*

Discipline : *Recherche Clinique, innovation technologie*

Unité de recherche : *UMR 1232 (CRCINA) INSERM / Université de Nantes Institut de
Recherche en Santé - Université de Nantes*

Evaluation de l'ADN circulant tumoral (ADNct) comme biomarqueur de réponse aux thérapies ciblées développées en phase précoce en oncologie

JURY

Président du jury	Alain MOREL, Professeur, Université d'Angers
Rapporteurs :	Jean-Yves PIERGA, Professeur PU-PH, Université de Paris Descartes Jean-Louis, MERLIN, Professeur PU-PH, Université de Nancy
Examineurs :	Alain MOREL, Professeur, Université d'Angers Olivier TREDAN, Docteur, Centre Léon Bérard Lyon
Directeur de Thèse :	Mario CAMPONE, Professeur PU-PH, Université d'Angers
Co-directeur de Thèse :	Sophie BARILLE, Docteur, Université de Nantes

Table des matières

Remerciements	5
Résumé.....	7
Abstract.....	8
Liste des tableaux	9
Liste des figures	10
Liste des abréviations.....	12
Préambule.....	14
Introduction.	15
1. Eléments historiques.....	15
1.1. Premiers travaux mentionnant l'existence d'ADN dans le plasma humain.	15
1.2. Premiers travaux dans le champ de la cancérologie.	16
1.3. Sémantique.	17
1.4. Synthèse.....	17
2. Aspects biologiques.....	18
2.1. Aspects structuraux de l'ADNc.....	18
2.1.1. Méthodes de mesure et taille des fragments.....	18
2.1.1.1. Electrophorèse d'acide nucléique.....	18
2.1.1.2. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) quantitative (qPCR).	18
2.1.1.3. Microscopie électronique et de force atomique.	21
2.1.1.4. Séquençage de masse en parallèle	22
2.1.2. Composition.....	24
2.2. Origines et mécanismes de libération de l'ADNc dans le compartiment sanguin.	24
2.2.1. Libération lors de la mort cellulaire par apoptose ou nécrose.	24
2.2.2. Sécrétion de l'ADNc par des cellules vivantes.	27
2.3. Métabolisme de l'ADNc.....	28
3. Aspects technologiques.....	29
3.1. Eléments pré-analytiques.	29

3.1.1.	Sérum versus plasma.	29
3.1.2.	Type de tube à utiliser pour le prélèvement et modalités de stockage.	30
3.1.3.	Centrifugation.	31
3.1.4.	Stockage.	31
3.1.5.	Méthodes d'extraction de l'ADNc.	31
3.1.6.	Méthodes de quantification de l'ADNc.	33
3.1.7.	Conclusion.....	33
3.2.	Approches méthodologiques.....	34
3.2.1.	Approche sur un locus unique.	35
3.2.2.	Approche de séquençage ciblé.....	35
3.2.3.	Séquençage d'exomes et approches de type génome entier.....	37
3.2.4.	Principaux kits commerciaux développés pour l'analyse de l'ADNct.	38
4.	Applications cliniques de l'analyse de l'ADNct en cancérologie : état des lieux.....	39
4.1.	Médecine théranostique : identification de cibles thérapeutiques et de mécanismes de résistance aux traitements.	39
4.1.1.	Identification des déterminants génomiques d'une réponse à une thérapie.	39
4.1.2.	Identification des mécanismes de résistance à une thérapie.	40
4.2.	Suivi de la réponse thérapeutique.....	42
4.3.	Médecine pronostique.....	44
4.4.	Dépistage et détection précoce des cancers.....	45
4.5.	Conclusion.....	47
	Résultats.	48
	Suivi longitudinal des mutations détectées dans l'ADNct pour évaluer la réponse clonale à une thérapie ciblée. (Frenel et al, 2015).	49
1.	Caractéristiques de la population et sélection.	51
2.	Extraction de l'ADN.....	55
3.	Séquençage de l'ADN.....	56
3.1.	Principes de la plateforme PGM	56
3.2.	Mise au point.	61
4.	Interprétations des données.....	62
5.	Concordance des mutations identifiées dans l'ADNct et le tissu tumoral correspondant.....	63
5.1.	Détails des mutations identifiées dans l'ADNct.	63

5.2. Validation des mutations par PCR digitale.	68
5.3. Concordance des mutations identifiées dans la tumeur et l'ADNct.....	70
6. Dynamique des mutations identifiées dans l'ADNct ou cours du traitement.	71
6.1. Patients présentant une diminution de la fréquence allélique des mutations dans l'ADNct en cours de traitement.	72
6.2. Patients présentant une augmentation de la fréquence allélique des mutations dans l'ADNct en cours de traitement.	77
6.3. Patient présentant une évolution discordante entre la variation de la fréquence allélique des mutations de l'ADNct et la réponse au traitement.	79
6.4. Potentielle évolution clonale mise en évidence par le suivi de plusieurs mutations dans l'ADNct au sein d'un même échantillon.....	81
6.5. Variations quantitative de la fréquence allélique des mutations dans l'ADNct et réponse au traitement.....	83
Discussion générale.	85
1. Analyse des mutations dans l'ADNct : validité du statut de biomarqueur.	85
2. Analyse de l'ADNct dans divers fluides biologiques.	87
3. Problématique des mutations dans l'ADNct avec une fréquence allélique >50%.	89
4. Quelles applications potentielles de l'ADNc à l'ère de l'immuno-oncologie ?	90
Travaux en cours et perspectives.	93
Bibliographie	96
Annexes	107

Remerciements

A **Mario Campone**, mon co-directeur de thèse et mentor qui m'accompagne depuis mes premiers jours dans le monde de l'oncologie. Merci infiniment de ta confiance.

A **Sophie Barille**, merci d'avoir accepté d'être co-directrice de cette thèse et de tes précieux commentaires

Aux **Pr Jean-Yves Pierga** et au **Pr Jean-Louis Merlin**, merci d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail

Au **Pr Alain Morel**, merci d'avoir accepté d'être membre de mon jury.

Au **Dr Olivier Trédan**, merci d'avoir accepté d'être membre de mon jury.

Au **Pr Johann De Bono**, à **Suzanne Carreira** et à **Jane Godall**. Sans vous, rien n'aurait été possible. Merci de votre confiance, merci d'avoir fait de mes 18 mois londoniens une « parenthèse enchantée ».

A **Vincent**, merci pour ton soutien, ta présence, ta patience. Merci de m'avoir fait découvrir la force de l'inconscient et la possibilité du changement.

Résumé

De l'ADN libre circulant (ADNc) dérivant de la tumeur peut être isolé dans le plasma des patients présentant un cancer. Cet ADNc tumoral (ADNct) permet un accès indirect à la tumeur puisqu'il porte les mêmes caractéristiques génétiques et épigénétiques et permet ainsi une biopsie liquide. Nous avons évalué l'intérêt du séquençage ciblé de l'ADNct comme biomarqueur de réponse à des thérapies ciblées développées en phase précoce en oncologie. Dans la première partie de ce travail, nous avons évalué les mutations identifiables par séquençage ciblé de l'ADNct d'une cohorte de 39 patients recevant un traitement anticancéreux dans le cadre d'un essai thérapeutique de phase I. Un total de 157 échantillons de plasma a été séquençé avec une couverture moyenne de 1685x. A l'initiation du traitement, 23 des 39 patients (59%) avaient au moins une mutation identifiable dans l'ADNct. Parmi les 44 mutations identifiées, *TP53*, *PIK3CA* et *KRAS* étaient les gènes les plus fréquemment mutés avec des fréquences de 41%, 20% et 18% respectivement. Dans un second temps, l'ADNc des patients ayant des mutations identifiées a été collecté et séquençé tous les mois au cours du traitement jusqu'à progression. Parmi les 23 patients, 13 ont reçu une thérapie ciblant directement l'anomalie moléculaire identifiée. Le suivi longitudinal des mutations identifiées dans l'ADNct et la dynamique des fréquences alléliques pendant le traitement a mis en évidence des variations associées à la réponse thérapeutique. Par ailleurs, pour les patients présentant plusieurs mutations identifiées dans un même échantillon d'ADNct, le suivi de ces mutations a mis en évidence la présence de clones évoluant de manière discordante au cours du traitement. Les variations quantitatives des fréquences alléliques des mutations dans l'ADNct étaient associées au temps jusqu'à progression sous traitement. L'ADNct est un biomarqueur d'intérêt pour le développement des thérapies ciblées en oncologie et fait l'objet de nombreux développements en oncologie qui seront discutés dans ce travail.

Mots Clés: ADN circulant tumoral, ADNct, biomarqueur, essai de phase précoce.

Abstract

Circulating cell free DNA (ccfDNA) deriving from tumor can be isolated in plasma of cancer patients. This circulating tumor DNA (ctDNA) shared the same genetics and epigenetics characteristics with the tumor and represents virtually a liquid biopsy. We evaluated whether targeted next-generation sequencing (NGS) of circulating tumor DNA (ctDNA) could be used for patient selection and as a tumor clone response biomarker in 39 patients with advanced cancers participating in early-phase clinical trials of targeted drugs. Overall, 159 plasma samples were sequenced with a mean sequencing coverage achieved of 1,685X across experiments. At trial initiation (C1D1), 23 of 39 (59%) patients had at least one mutation identified in ctDNA. Out of the 44 mutations identified at C1D1, *TP53*, *PIK3CA* and *KRAS* were the top three mutated genes identified, with 18 (41%), nine (20%), eight (18%) different mutations, respectively. In the second part of this work, we performed sequential NGS of ctDNA for the 23 patients with ctDNA mutation identified at C1D1. The monitoring of mutation allele frequency in consecutive plasma samples during treatment with targeted drugs demonstrated potential treatment associated clonal responses. Longitudinal monitoring of ctDNA samples with multiple mutations indicated the presence of separate clones behaving discordantly. Molecular changes at ctDNA mutation level were associated with time to disease progression. Targeted NGS of ctDNA has potential clinical utility to monitor the delivery of targeted therapies and current and future directions are discussed.

Key words: circulating tumor DNA, ctDNA, biomarker, early phase clinical trials

Liste des tableaux

Tableau 1. Etapes clé de la découverte de l'ADNc.	17
Tableau 2. Principaux kits commercialisés.	32
Tableau 3. Tests commerciaux développés pour l'analyse de l'ADNc en oncologie.	38
Tableau 4. Caractéristiques des patients inclus dans cette étude.	53
Tableau 5. Types de traitement reçus par les patients et voies moléculaires ciblées.	54
Tableau 6. Concordance des mutations détectées dans l'ADNct et la tumeur.	64
Tableau 7. Détails des mutations identifiées dans l'ADNct et le tissu tumoral.	65
Tableau 8. Validation des mutations et des fréquences alléliques sur la plateforme droplet digital PCR (Biorad) sur 19 échantillons pris au hasard. ND : non détectée.	69
Tableau 9. Temps à progression selon le delta de fréquence allélique des mutations identifiées dans l'ADNct entre C2D1 et C1D1 (seuil de 30%) et corrélation avec l'évaluation selon les critères RECIST.	84

Liste des figures

Figure 1. Principe de la mesure de la taille des fragments d'ADNc par la méthode de qPCR. Adapté de Jiang (22).	19
Figure 2. L'ADNct est plus fragmenté que l'ADNc non tumoral. Adapté de Diehl (28).	20
Figure 3. Visualisation par microscopie de force atomique de fragments d'ADNc chez un patient porteur de cancer colorectal. Adapté de Moulière (31).	21
Figure 4. Distribution de la taille des fragments d'ADNct évaluée par la méthode de microscopie de force atomique chez un patient porteur de cancer colorectal. Adapté de Moulière (31).	22
Figure 5. Distribution de la taille des fragments d'ADNc déterminée par séquençage de nouvelle génération, en fonction de l'estimation de la fraction d'ADNct dans l'ADNc. A partir de patients porteurs de carcinome hépato-cellulaire. Adapté de Jiang (35).	23
Figure 6. Evolution des concentrations d'ADNc et de leur profil de taille dans un modèle murin après induction de l'apoptose et de la nécrose. Adapté de Jahr (17).	26
Figure 7 : Recommandations pré analytiques pour l'extraction de l'ADNc.	33
Figure 8 : Principales techniques d'analyse de l'ADNc. Adapté de Riva et al (70).	34
Figure 9 : La détection de l'ADNct par ddPCR après le traitement à visée curative d'un cancer du sein prédit la survie sans progression. Adapté de Garcia-Murillas (113).	44
Figure 10 : Applications potentielles de l'ADNct en oncologie à tous les stades la maladie et concepts émergents. Adapté de Diehl, ASCO meeting 2017.	47
Figure 11. Diagramme CONSORT.	52
Figure 12. Préparation de la librairie avant séquençage sur le plateforme Ion Torrent. D'après https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/brands/ion-torrent.html	57
Figure 13. Préparation de la matrice séquençage sur le plateforme Ion Torrent. D'après https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/brands/ion-torrent.html	58
Figure 14. Principe du séquençage sur le plateforme Ion Torrent. D'après https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/brands/ion-torrent.html	59
Figure 15. Interprétation des données de séquençage Ion Torrent. D'après https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/brands/ion-torrent.html	60
Figure 16. Corrélation des fréquences alléliques pour un même échantillon en séquençage sur la plateforme PGM et en PCR digitale sur la plateforme Biorad.	70
Figure 17. Patiente #1. Variations de la fréquence allélique au cours du traitement des mutations identifiées dans l'ADNct et évolution de la concentration totale de l'ADNct au cours du traitement pour la patiente.	72

Figure 18. Patient #18. Variations de la fréquence allélique au cours du traitement des mutations identifiées dans l'ADNct et évolutions de la concentration de l'ADNct au cours du traitement pour la patiente. Evolution des images scannographiques au cours de temps.....	74
Figure 19. Patiente #23. Variations de la fréquence allélique au cours du traitement des mutations identifiées dans l'ADNct et évolution de la concentration de l'ADNct au cours du traitement pour la patiente.....	75
Figure 20. Patiente #39. Variations de la fréquence allélique au cours du traitement des mutations identifiées dans l'ADNct et évolution de la concentration de l'ADNct au cours du traitement pour la patiente.....	76
Figure 21. Patiente #29. Variations de la fréquence allélique au cours du traitement des mutations identifiées dans l'ADNct et évolution de la concentration de l'ADNct au cours du traitement pour la patiente.....	77
Figure 22. Patiente #5. Variations de la fréquence allélique au cours du traitement des mutations identifiées dans l'ADNct et évolution de la concentration de l'ADNct au cours du traitement pour la patiente.....	78
Figure 23. Patiente #6. Variations de la fréquence allélique au cours du traitement des mutations identifiées dans l'ADNct et évolution de la concentration de l'ADNct au cours du traitement pour la patiente.....	79
Figure 24. Patiente #16. Variations de la fréquence allélique au cours du traitement des mutations identifiées dans l'ADNct et évolution de la concentration de l'ADNct au cours du traitement pour la patiente.....	80
Figure 25. Suivi au cours du temps des fréquences alléliques d'échantillons d'ADNct avec plusieurs mutations différentes identifiées.	82
Figure 26. Niveau de méthylation du promoteur de PDL1 dans l'ADNc de patients et corrélation avec le niveau de méthylation dans le tissu tumoral.....	94

Liste des abbreviations

A	Adenine
ACCE	Analytic validity, Clinical Validity, Clinical Utility and associated Ethical, legal and social complications)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN circulant
ADNct	ADN circulant tumoral
APC	Adenomatous polyposis coli
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ASCO	American society of clinical oncology
BEAMing	Beads, emulsion, amplification, magnetics
BPER	Base position error rate
C	Cytosine
Capp-Seq	Cancer personalized profiling by deep sequencing
CAST-PCR	Competitive allele-specific TaqMan PCR
CcfDNA	Circulating cell free DNA
COLD-PCR	Co-amplification at lower denaturation temperature-PCR
CONSORT	Consolidating Standard of Reporting trials
COSMIC	Catalogue of somatic mutations in cancer
CPT	Cell preparation tube
CtDNA	Circulating tumor DNA
DdPCR	Digital droplet PCR
DNase	Désoxyribonuclease
EBV	Epstein Barr virus
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
EMA	European medicines agency
FA	Fréquence allélique
FDA	Food and drug administration
FFPE	Formalin-fixed, Paraffin-embedded
G	Guanine
IGV	Integrative Genomics Viewer
ISP	Ion sphere particles
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LDH	Lactate déshydrogénase

LED	Lupus erythémateux disséminé
MIT	Massachusetts Institute of Technology
NGS	Next generation sequencing
PCR	Polymerase chain reaction
PGM	Personal genome machine
qPCR	Quantitative PCR
RECIST	Response evaluation criteria in solid tumors
SNV	Single nucleotid variant
SNP	Single nucleotid polymorphism
T	Threonine
TEC-Seq	Targeted error correction sequencing

Préambule.

La caractérisation moléculaire des cancers et les développements récents de multiples thérapies ciblées en oncologie impliquent le développement parallèle de nouveaux biomarqueurs à visée diagnostique, pronostique et théranostique. Dans ce contexte, l'ADN circulant d'origine tumoral (ADNct) a émergé ces dix dernières années comme un biomarqueur d'intérêt majeur.

Ce travail de thèse est fondé sur la mise en œuvre d'un programme de séquençage de l'ADNct dans l'unité thérapeutique de phase I du *Royal Marsden Hospital* de Londres. Le but de ce programme était de mettre en œuvre la collecte et l'analyse de l'ADNct chez les patients inclus dans les essais thérapeutiques de phase précoce.

Pendant 18 mois, entre Novembre 2012 et Mai 2014, j'ai été responsable de la mise en œuvre de ce programme sous la responsabilité du Pr Johann De Bono à *l'Institute for Cancer Research, London*. Dans ce travail expérimental, j'ai été responsable de la coordination de la collection des échantillons, de l'optimisation de l'extraction de l'ADNc, de la mise au point et l'optimisation de la méthode de séquençage de l'ADNct sur la plateforme PGM. L'analyse bio-informatique des résultats a été réalisée conjointement avec le Dr S Carreira.

Cette thèse comporte 3 parties. La première, synthétise les données connues sur les aspects biologiques et technologiques de l'ADNct avec une perspective historique. La deuxième partie présente les principaux résultats de ce programme, qui ont fait l'objet d'une publication en 2015 dans *Clinical Cancer Research* (1). Enfin, la dernière partie propose une mise en perspective de ce travail afin d'identifier les étapes nécessaires à la véritable implémentation de cette technologie dans la routine clinique et les futures applications.

Introduction.

1. Eléments historiques.

1.1. Premiers travaux mentionnant l'existence d'ADN dans le plasma humain.

Il y a plus de 70 ans, 5 ans avant la description de la structure en double hélice de l'ADN par Watson et Crick, Mandel et Métais ont identifié pour la première fois la présence d'acides nucléiques dans le plasma humain (2). Des concentrations élevées d'ADN dans le sang total de patients porteurs de leucémie avaient déjà été décrites, mais ils ont identifié pour la première fois la présence d'ADN et d'ARN dans le plasma de volontaires sains et de sujets atteints de pathologies variées telles que la cirrhose, l'insuffisance cardiaque ou la goutte. Les concentrations moyennes mesurées étaient de l'ordre du milligramme par millilitre de plasma. Ils ont aussi décrit des concentrations d'ADN plasmatique élevées chez la femme enceinte et, visionnaires, affirment « il y a là une étude à faire que nous proposons de poursuivre ».

Ce champ de recherche est resté longtemps inexploré jusque dans les années 60, avec l'identification d'ADN dans le sang de patients atteints de lupus érythémateux disséminé (LED) (3). La présence dans le sérum de ces patients d'un facteur réagissant avec l'ADN était connue depuis la fin des années 50. Les travaux de Tan, en utilisant le sérum de ces patients et donc des anticorps réagissant contre l'ADN comme un test diagnostique, ont démontré la présence d'ADN dans le sérum des patients avec un LED. Ces anticorps pouvaient réagir contre de l'ADN natif ou dénaturé par chauffage ou sonication. On pense à l'époque que ce couple anticorps/antigène est le mécanisme physiopathologique de cette maladie comme le suggère la détection de ces complexes sur des lésions de glomérulonéphrite associée au LED. Des travaux ultérieurs établissent que l'ADN plasmatique des patients avec un LED est en grande partie simple brin et l'on voit apparaître pour la première fois en 1973 le terme de « *circulating single strand DNA* » préfigurateur d'ADN libre circulant (ADNc) (4).

L'identification de cet ADNc dans des conditions pathologiques a logiquement conduit à son étude en contexte physiologique avec des résultats discordants, expliqués principalement par la faible sensibilité des méthodes de mesure. Les travaux de Steinman, comparant 4 méthodes de mesures différentes, ne confirmaient pas avec certitude la présence d'ADNc dans des conditions physiologiques (5).

1.2. Premiers travaux dans le champ de la cancérologie.

En 1965, un premier article mentionne un lien possible entre la présence d'ADNc et la dissémination tumorale, à partir d'un modèle de polyomavirus (6). Ainsi, dans un modèle murin, de l'ADN viral de polyomavirus administré par voie intra péritonéale puis retrouvé dans le plasma et réinjecté chez d'autres souris, garde des propriétés oncogéniques. Les premiers travaux observant des concentrations élevées d'ADNc chez des patients atteints de cancers sont réalisés par Leon, 30 ans après la première identification de l'ADNc par Métel et Mandais (7). Dans une série de 166 patients porteurs de différents cancers, ces travaux montrent que la concentration d'ADNc était supérieure chez les patients métastatiques et qu'un traitement à visée oncologique comme la radiothérapie pouvait diminuer cette concentration de 66 à 90%, 2 semaines après le début du traitement. La diminution de la concentration d'ADNc était le plus souvent associée à une réduction de la taille tumorale ou une diminution des symptômes. En outre, parmi les 17 patients décédés en moins d'un an, la plupart avaient une concentration d'ADNc qui avait augmenté ou était restée stable malgré le traitement. On perçoit ici les premières données suggérant la possibilité d'évaluer la réponse thérapeutique à un traitement oncologique par le biais de variations quantitatives de l'ADNc.

Au-delà de ces aspects quantitatifs, l'origine tumorale de l'ADNc est évoquée 14 ans plus tard, en 1981 L'équipe de Beljanski a identifié des propriétés inhérentes à l'ADN tumoral, telles qu'une diminution de la stabilité des brins d'ADN, ainsi qu'une stimulation plus importante de la synthèse d'ADN dans les cellules tumorales comparées aux cellules normales dans les mêmes conditions *in vitro* (8). La répétition de ces travaux à partir d'ADNc de 53 patients porteurs de différents types tumoraux et non traités, met en évidence les mêmes différences de caractéristiques physico-chimiques de l'ADNc par rapport au contrôle. Ils formulent ainsi l'hypothèse que l'ADNc isolé dans le plasma est d'origine tumorale compte tenu de ses caractéristiques physico-chimiques (9).

Ces travaux précurseurs seront confirmés dans les années 90, avec la mise en évidence dans l'ADNc de mutations d'oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs spécifiques des cellules cancéreuses, d'altérations du nombre de copies de ces mêmes gènes ou la mise en évidence de modifications épigénétiques. Ces observations prouvent de façon concrète l'origine tumorale de l'ADNc et son relargage dans le plasma à partir des cellules tumorales (10-13). Le terme ADN circulant tumoral (ADNct) est alors utilisé.

Par les suites de multiples travaux réalisés partir des années 2000 ont évalué le rôle diagnostique et pronostique de ce biomarqueur (14, 15).

1.3. Sémantique.

Sur la base des données précédentes, 2 termes coexistent dans la littérature :

- ADN libre circulant (ADNc) ou *cell free DNA (cfDNA)*
- ADN tumoral libre circulant (ADNct) ou *circulating tumor DNA (ctDNA)*.

L'ADNc isolé chez les patients porteurs de cancer renferment 2 fractions : l'ADNc, libéré par des cellules normales et que l'on peut identifier chez des sujets sains dans différentes situations physiologique et l'ADNct, libéré par les cellules tumorales et dans lequel on peut identifier des anomalies génétiques spécifiques de la tumeur, prouvant son origine tumorale. Ces éléments seront discutés dans la partie 2.2.

1.4. Synthèse.

Tableau 1. Etapes clé de la découverte de l'ADNc.

1948	Identification d'ADN dans le sang	(2)
1965	Implication de l'ADNc dans l'oncogenèse	(6)
1966-1975	Détection de concentrations élevées d'ADNc chez des patients atteints de lupus, polyarthrite rhumatoïde ou de leucémie	(3-5)
1977	Découverte de l'aspect pronostique des concentrations d'ADNc en fonction du stade tumoral	(7)
1989	Description de similitudes entre l'ADNc et l'ADN tumoral pour un patient donné	(9)
1994-1999	Identification de la présence d'altérations moléculaires dans l'ADNc	(10-13)
2000-2010	Rôle diagnostique et pronostique de l'ADNc dans des pathologies variées.	(14, 15)

2. Aspects biologiques.

2.1. Aspects structuraux de l'ADNc.

2.1.1. Méthodes de mesure et taille des fragments.

2.1.1.1. Electrophorèse d'acide nucléique.

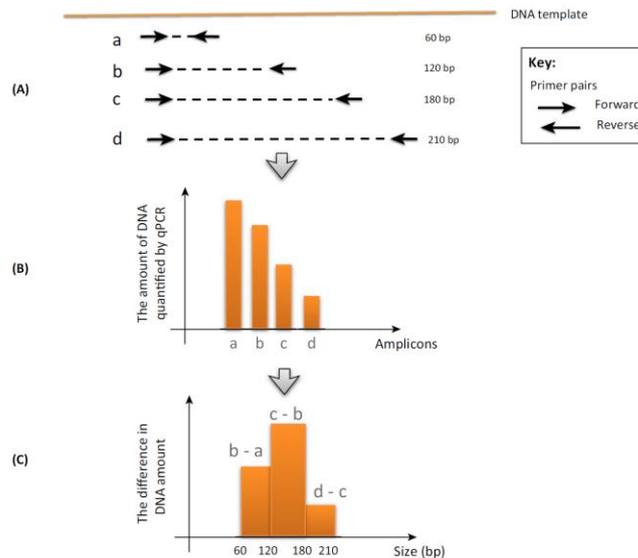
Les premières mesures de taille de l'ADNc ont été réalisées par des méthodes d'électrophorèse d'acides nucléiques extraits de plasma. Les profils électrophorétiques montraient de façon typique une succession de fragments dont la taille était un multiple de 180 paires de base (pdb), la taille de la sous-unité nucléosomale (16, 17). Des tracés similaires ont été observés chez des patients porteurs de cancer ou atteints de lupus érythémateux disséminé (18, 19). La résolution de cette approche est relativement limitée pour différencier et quantifier la distribution de taille de l'ADNc.

2.1.1.2. PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitative (qPCR).

Le développement des techniques de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitative (qPCR) a permis par la suite un second type d'approche pour estimer la taille des fragments d'ADNc. En utilisant des amplicons de tailles différentes couvrant une même zone d'intérêt, le rendement quantitatif des amplicons testés permet de déduire la quantité relative des fragments d'ADNc d'une taille donnée (Figure 1). Ces données quantitatives peuvent être traduites en un index d'intégrité de l'ADNc (ratio entre les fragments de grande taille et de petite taille) qui estiment le degré de dégradation de l'ADNc (20, 21). Ainsi, plus l'index d'intégrité est élevé, moins l'ADNc est dégradé.

Figure 1. Principe de la mesure de la taille des fragments d'ADNc par la méthode de qPCR. Adapté de Jiang (22).

- (A). Des paires de *primer* générant des amplicons de taille différente pour une séquence donnée sont synthétisées.
 (B). Les amplicons de petite taille ont un rendement apparent meilleur puisqu'ils couvrent tous les fragments au moins égaux à leur taille.
 (C). Les différences de rendement de chaque amplicon permettent de déduire la taille des fragments d'ADNc.



Cette approche a été utilisée pour l'étude de l'ADNc fœtal chez la femme enceinte. En effet, l'ADNc chez la femme enceinte contient des fragments d'ADN provenant du fœtus. Une étude publiée en 2003 a comparé les profils de taille d'ADNc chez 31 femmes enceintes de garçons et 34 femmes non enceintes en ciblant par le gène de la leptine (ubiquitaire) et le gène *SRY*, présent uniquement chez le fœtus mâle (23). Ainsi la distribution de taille des fragments d'ADNc porteur du gène de la leptine représente préférentiellement l'ADNc d'origine maternelle tandis que la distribution de taille des fragments d'ADNc porteur du gène *SRY* représente l'ADNc d'origine fœtal. Dans cette étude, l'ADNc d'origine fœtal était plus fragmenté que l'ADNc d'origine maternelle.

Chez les patients atteints de cancer, cette approche a été particulièrement développée pour comparer la taille des fragments d'ADNc d'origine tumorale (ADNct) et non tumoral. Initialement, l'intégrité de l'ADNc chez des patients atteints de cancer semblait plus importante comparée à des individus sains, avec des fragments d'ADNc de plus grande taille (24-27). Ce profil était réversible après traitement et sa persistance en cours de traitement était de mauvais pronostic. Des données plus récentes ont infirmé ces données. Diehl a réalisé le séquençage des produits de PCR couvrant le gène *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*) avec des tailles

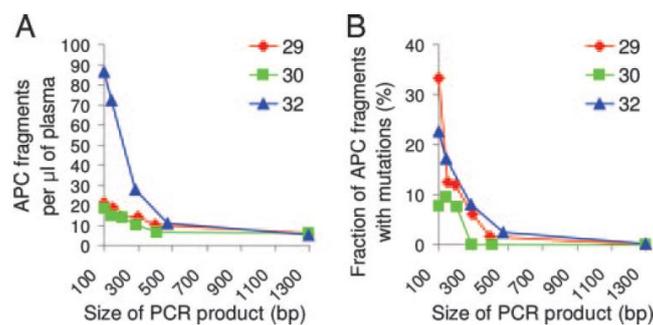
d'amplicons variables chez des patients porteurs de cancer du côlon (28). En corrélant les variables « fraction des fragments porteurs de la mutation *APC* » et « taille de l'amplicon », les auteurs ont établi que la détection de la mutation était très fréquente pour les fragments de petite taille (Figure 2). Par conséquent, la fraction d'ADNc dans laquelle était identifiée la mutation *APC* spécifique de la tumeur et donc d'origine tumorale (ADNct) semble plus dégradée que la fraction d'ADNc dans laquelle il n'est pas mis en évidence de mutation pour cette même séquence génique (ADN libre circulant).

Figure 2. L'ADNct est plus fragmenté que l'ADNc non tumoral. Adapté de Diehl (28).

Relation entre la taille des amplicons et le nombre de copies du gène *APC* dans l'ADNc chez 3 patients porteurs de cancer du côlon (n° 29, 30,32).

(A). Détermination du nombre de copie du gène *APC* (sauvage + muté) par PCR digitale avec des amplicons de taille variable.

(B). Fraction des fragments porteurs d'une mutation du gène *APC* en fonction de la taille des fragments.



Des travaux ultérieurs ont confirmé ces observations dans un modèle de xénogreffe murin et chez des patients porteurs de cancer colorectal *KRAS* mutés (20, 21, 29). Ce modèle permet d'analyser avec certitude l'ADNct puisque les séquences d'ADN humaine identifiées dans l'ADNc proviennent avec certitude de la xénogreffe tumorale. Dans ce modèle : i) la fragmentation de l'ADNct était corrélée à l'augmentation de la masse tumorale, ii) le nombre de copies du gène *KRAS* mutées était plus élevé pour les fragments d'ADNct de taille inférieure à 150 pdb, iii) la proportion d'ADNc (nombre de copies du gène *KRAS* muté/ nombre de copies du gène *KRAS* sauvage) était inversement corrélée à la taille des amplicons (20% de la quantité totale d'ADNc détectée avec des amplicons de 400 pdb contre 85% pour des amplicons de 60 pdb). Ce type d'approche n'est possible que sur des loci prédéterminés et ne permet donc pas une analyse du génome entier.

2.1.1.3. Microscopie électronique et de force atomique.

La microscopie électronique et de force atomique ont été utilisées pour observer la conformation et mesurer la taille de des molécules d'ADNc. Par ces techniques, la mesure de taille est déduite en estimant la taille d'une paire de bases à 0.34nm. En microscopie électronique, la distribution de taille chez des sujets sains variait de 1200 à 1800 pdb alors qu'une seconde étude a retrouvé plutôt une distribution continue entre 88 et 28500 pdb (16, 30). Ces différences semblent être expliquée par les méthodes de préparation des échantillons.

La visualisation directe des fragments d'ADNc par microscopie de force atomique (Nanoscope IIIa, Veeco, Santa Barbara, CA, USA) a été réalisée chez des patients porteurs de cancer colorectal (31). La mesure de la taille des fragments a été réalisée par l'acquisition numérique de 10 images pour chaque échantillon de 2 μ l d'ADNc. Un total de 1300 fragments a été mesuré avec une taille variant de 15 à 63 nm (Figure 3). L'ADNc des patients porteurs de cancer colorectal était plus fragmenté que les sujets sains avec une taille médiane de 135 pdb *versus* 180 (Figure 4).

Ces approches méthodologiques nécessitent la mise en œuvre de procédures assez lourdes, longues à réaliser et ont été peu développées.

Figure 3. Visualisation par microscopie de force atomique de fragments d'ADNc chez un patient porteur de cancer colorectal. Adapté de Moulière (31).

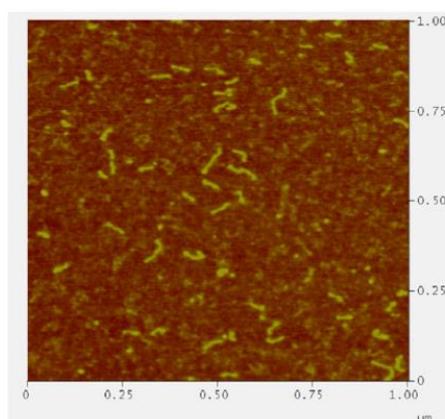
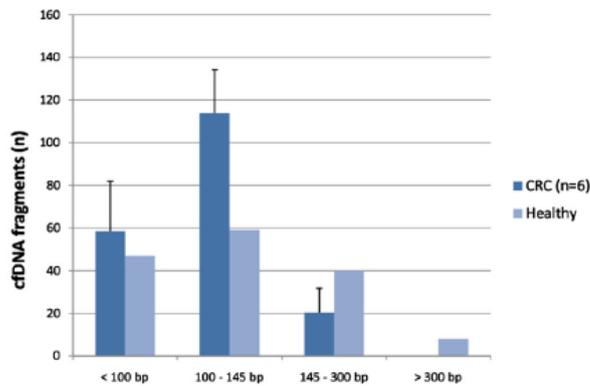


Figure 4. Distribution de la taille des fragments d'ADNct évaluée par la méthode de microscopie de force atomique chez un patient porteur de cancer colorectal. Adapté de Mouliere (31).



2.1.1.4. Séquençage de masse en parallèle

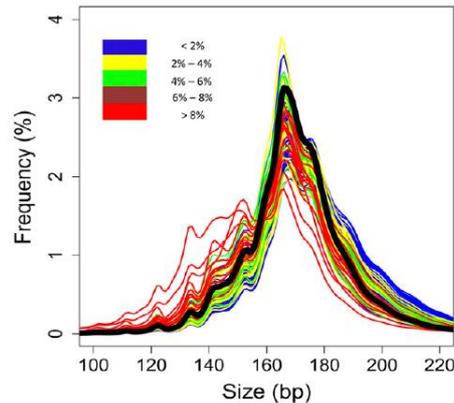
Le développement du séquençage de masse en parallèle permet désormais de déterminer la taille de millions de fragments d'ADN en même temps par la technique du séquençage « en paire » des extrémités où de courts fragments sont séquencés et alignés au génome de référence (32, 33). Par opposition aux techniques précédentes, cette méthode permet une analyse du génome de façon globale avec une résolution d'une seule base.

En 2010, une étude utilisant une approche génome entier, chez une femme enceinte, a montré que l'ADNc global était fragmenté avec une prédominance de fragments de 166 pdb alors que l'ADNc d'origine foetal était constitué en majorité de fragments 143 pdb (34). La distribution de la taille des fragments de taille inférieure avait une périodicité de 10 pdb.

Chez des patients porteurs de carcinome hépatocellulaire, un même type d'approche confirme ces résultats (35). Ces tumeurs présentent des variations du nombre de copie de gènes incluant des amplifications de 1q et 8q et des délétions des chromosomes 1p et 8q. De façon attendue, les régions chromosomiques délétées de ces tumeurs contribuent moins à la fraction ADNc alors que les régions fréquemment amplifiées du chromosome 1 et 8 sont surreprésentées dans l'ADNc. La distribution de taille de ces régions d'intérêt montre un pic principal à 166 pdb et une série de pics de taille inférieure répartis toutes les 10 pdb à partir de 143 pdb (Figure 5). Plus la fraction d'ADNct augmente dans l'ADNc, plus l'ADNc apparaît fragmenté et inversement.

Figure 5. Distribution de la taille des fragments d'ADNc déterminée par séquençage de nouvelle génération, en fonction de l'estimation de la fraction d'ADNct dans l'ADNc. A partir de patients porteurs de carcinome hépato-cellulaire. Adapté de Jiang (35).

La distribution de taille médiane est représentée par la courbe noire. La distribution de taille chez les patients porteurs d'un carcinome hépatocellulaire est représentée en fonction de la fraction d'ADNc d'origine tumorale dans l'ADNc.



Ces données ont été confirmées dans plusieurs modèles tumoraux, successivement dans un modèle de xénogreffe de glioblastome et de carcinome hépatocellulaire, puis chez des patients porteurs de mélanome avec une mutation de *BRAFV600E* et des patients atteints de cancer du poumon avec une mutation de l'*EGFR T790M* (36). Dans cette étude de 2016, la longueur des fragments d'ADNc était principalement de 167 pnb alors que l'ADNct était plus fragmenté (134 et 144 pnb) avec une distribution de 10 pnb pour les fragments d'ADNct de taille inférieure.

En conclusion, l'ensemble des études montrent que l'ADNc d'origine tumorale est plus fragmenté que l'ADNc non tumoral, avec une taille moyenne de 160 pnb environ. Cette fragmentation est un élément important puisqu'elle implique des approches technologiques adaptées pour permettre leur détection. D'autres travaux mentionnent la présence de fragments de grande taille dans l'ADNc, de plus de 10000 pnb (17). Peu d'études ont montré l'existence de tels fragments probablement pour des raisons technologiques. En effet, les techniques de séquençage les plus couramment utilisées ne sont pas adaptées pour séquencer de si longs fragments et les méthodes d'extraction de l'ADNc couramment utilisées peuvent sélectionner la taille des fragments recouverts. Une étude récente utilisant une technologie de type nano pore chez une femme enceinte a identifié des fragments de d'ADNc de taille supérieure à 1000 pnb en petite quantité (0,06% à 0,3%) (37).

2.1.2. Composition.

La composition et la structure de l'ADNc sont relativement peu étudiées dans la littérature. L'équipe de Stroun a été la première à caractériser l'ADNc *via* une technique d'extraction au phénol suivie par une purification sur une colonne concavalin-A puis une ultracentrifugation (18, 38). Le matériel biologique ainsi isolé était de l'ADN double brin, résistant au RNase et pronase mais clivable avec une DNase 1. Cet ADN n'était pas nu mais faisait partie de complexes et pouvait être lié à la surface cellulaire *via* des protéines présentant des caractéristiques spécifiques de liaison à l'ADN (39).

Les travaux plus récents de Holdenrieder ont démontré la possibilité d'une liaison l'ADNc - histones et sa présence principalement sous cette forme nucléosomale. (40). En comparant deux méthodes de dosage de l'ADNc, l'une classique par PCR et l'autre par détection immunologique d'ADN nucléosomal, il a démontré une excellente concordance de ces deux méthodes chez des patients traités pour un cancer du pancréas ou un accident vasculaire cérébral.

La prédominance d'ADNc sous forme nucléosomale est aussi suggérée par la taille des fragments isolée. En effet la taille moyenne de 166 pdb correspond à la longueur d'ADN entourant un nucléosome (147 pdb) plus le lien d'ADN associé à l'histone H1.

2.2. Origines et mécanismes de libération de l'ADNc dans le compartiment sanguin.

Les mécanismes de libération de l'ADNc dans la circulation sanguine restent relativement mal élucidés. Deux hypothèses sont évoquées, i) la libération par des cellules lors des mécanismes de mort cellulaire par apoptose ou nécrose, ii) la sécrétion par des cellules vivantes.

2.2.1. Libération lors de la mort cellulaire par apoptose ou nécrose.

L'hypothèse d'une libération d'ADNc lors de la mort cellulaire par nécrose de cellules tumorales est formulée dès les années 90 sur des observations cliniques: les patients ayant une forte masse tumorale ont les concentrations d'ADNc les plus élevées (11, 18, 41). L'hypothèse de la libération d'ADNc lors de la mort cellulaire par apoptose est suggérée par

la distribution de taille des fragments d'ADNc (aux alentours de 166 pdb). En effet, l'électrophorèse des fragments d'ADNc montre un profil similaire à une échelle (*ladder like*) comparable à celui des fragments libérés par des cellules en apoptose et la distribution des fragments plus petits avec une périodicité de longueur de 10 pdb, évoque la dégradation par des nucléases clivant le brin d'ADN sur des sites périodiquement exposés, à chaque tour de la double hélice d'ADN. Il s'agit alors de simples hypothèses formulées sur la distribution de la taille des fragments observés (16, 41).

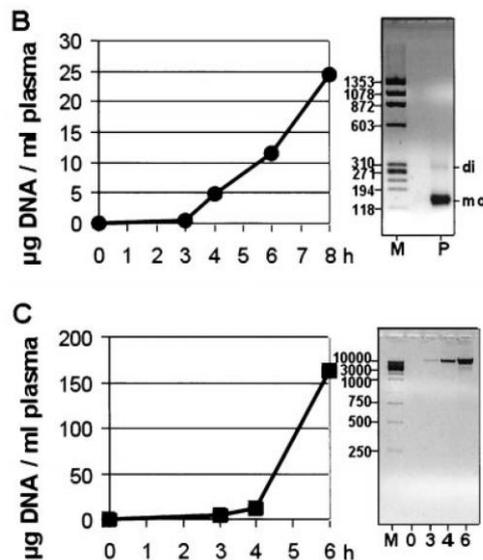
Les premiers travaux confirmant ces hypothèses d'un point de vue mécanistique datent de 2001 (17). Le promoteur du gène *CDKN2A* est fréquemment méthylé dans plusieurs types de cancer. L'équipe de Jahr a déterminé le statut de méthylation de ce gène dans l'ADNc de 25 patients traités pour un cancer. Parmi les 25 patients, 11 présentaient une hyperméthylation du promoteur de ce gène dans l'ADNc avec une concordance parfaite avec la tumeur primitive. Pourtant, le ratio méthylé/non méthylé du gène *CDKN2A* n'était jamais de 100%, variant de 10 à 90%. Les auteurs émettent l'hypothèse que pour les patients ayant une tumeur avec une méthylation du gène *CDKN2A*, des ratios méthylé/non méthylé variant de 10 à 90% dans l'ADNc impliquent nécessairement la présence d'ADNc non tumoral dans l'ADNc.

Dans un modèle de souris, la même équipe a étudié les profils d'ADNc après l'induction d'apoptose par injection d'anti CD95 (inducteur d'apoptose dans les hépatocytes) ou de nécrose par injection d'acétaminophène (17) (Figure 6). Quatre heures après l'induction d'apoptose, il était observé une augmentation des concentrations d'ADNc avec un maximum à 8h. L'électrophorèse des fragments montrait des fragments de la taille de mono ou di-nucléosome. L'induction de la nécrose montrait des profils évolutifs de l'ADNc similaires en termes de cinétiques. En revanche, la taille des fragments libérés était en majorité > 10 000pdb. Ces travaux démontrent pour la première fois les différents mécanismes conduisant à la libération d'ADNc et la possibilité de les discriminer selon la taille des fragments observés.

Figure 6. Evolution des concentrations d'ADNc et de leur profil de taille dans un modèle murin après induction de l'apoptose et de la nécrose. Adapté de Jahr (17).

(B). Cinétique des concentrations d'ADNc *in vivo* après induction de l'apoptose par anti-CD95 chez le rat et profil électrophorétique des fragments isolés.

(C). Cinétique des concentrations d'ADNc *in vivo* après induction de nécrose cellulaire par acétaminophène chez le rat et profil électrophorétique des fragments isolés.



L'ADNc isolé chez les patients porteurs de cancer contient à la fois de l'ADNct et l'ADNc provenant de cellules non tumorales. En outre de l'ADNc est isolé chez des individus sains. La question posée est donc l'origine de cette ADN non tumoral.

Il est possible de déterminer le tissu d'origine d'un fragment d'ADN par l'analyse du profil de méthylation du fragment. En effet, le méthylome est unique en fonction du tissu d'où provient le fragment d'ADN. Par cette approche, il a été identifié de l'ADNc provenant de cellules de pancréas endocrine chez des patients diabétiques, provenant d'oligodendrocytes chez des patients ayant une sclérose en plaque ou un traumatisme crânien (42).

La majeure partie de l'ADNc isolé chez les individus sains et chez les patients porteurs de cancers provient des cellules hématopoïétiques (43). Cette équipe a pu réaliser une cartographie du positionnement des nucléosomes sur des fragments d'ADNc par une méthode de séquençage. Ils font l'hypothèse que la taille de fragment d'ADNc et le positionnement des sites de clivages des extrémités renseigne sur le positionnement des nucléosomes. Ainsi, le profil de fragmentation de l'ADNc contient cette empreinte épigénétique et renseigne sur le

tissu d'où provient ce fragment d'ADNc. Ils démontrent que chez les volontaires sains, les fragments d'ADNc portent essentiellement l'empreinte épigénétique des cellules de la lignée lymphoïde et myéloïde et déduisent que l'ADNc dans des conditions physiologiques provient principalement des cellules hématopoïétiques. En revanche, chez des patients porteurs de cancer, la majeure partie de l'ADNc provenait d'autres tissus que les cellules hématopoïétiques.

2.2.2. Sécrétion de l'ADNc par des cellules vivantes.

L'ADNct peut être identifié à des stades très précoces du cancer, où les phénomènes d'apoptose et de nécrose sont relativement faibles (44). Cet élément soulève l'hypothèse d'une origine alternative de l'ADNct. Par ailleurs, le profil « ladder-like » de l'ADNct en électrophorèse peut être observé en dehors de mécanismes d'apoptose, lors d'un relargage actif par des cellules viables (38). En condition physiologique, le contenu des cellules apoptotiques est rapidement absorbé par les macrophages et digéré par des DNases de type II dans les lysosomes (45). On peut formuler l'hypothèse que les fragments d'ADN libérés lors de l'apoptose puissent être d'abord ingérés par les macrophages puis digérés et sécrétés activement. Des études *in vitro* ont montré que les lymphocytes peuvent libérer en continu de l'ADN dans leur milieu (46).

Les cellules tumorales et non tumorales sécrètent dans leur environnement des vésicules membranaires collectivement appelées vésicules extracellulaires qui agissent comme des messagers intercellulaires. On distingue les microvésicules, libérées par bourgeonnement de la membrane plasmique ou lors de la destruction des corps apoptotiques lors de la mort cellulaire et les exosomes. Ces derniers sont formés à l'intérieur de compartiments de la voie d'endocytose, les corps multi vésiculaires, et sécrétés lors de la fusion des corps multi vésiculaires avec la membrane plasmique. Ces vésicules peuvent être isolées dans les liquides biologiques et en particulier dans le plasma et contiennent des protéines, des ARNm et de l'ADN.

De larges fragments d'ADN ont été isolés dans les exosomes de patients porteurs de cancer du pancréas. Ces fragments d'ADN portaient des mutations spécifiques (*TP53* et *KRAS*) (47). Les exosomes contiennent une large fraction d'ADN d'origine tumoral variant de 56 à 82% selon les patients (48). Une étude récente a comparé les mutations détectées dans la tumeur, dans l'ADN extrait des exosomes et dans l'ADNct de 43 patients. Parmi ces patients, des mutations l'*EGFR*, *BRAF* et *KRAS* ont retrouvées dans la tumeur chez 41 patients. Par techniques de NGS, ces mutations étaient retrouvées dans 95% des patients dans l'ADN

issues des exosomes, dans 92% des patients dans l'ADNct par technique de ddPCR et dans 97% des patients dans l'ADNct par technique de BEAMING (49).

Même si cette fraction ne correspond pas au sens strict à de l'ADNc, les exosomes sont des biomarqueurs circulant qui contiennent de l'ADN d'origine tumoral qui peut être exploité à visée diagnostique ou théranostique.

2.3. Métabolisme de l'ADNc.

Les processus d'élimination de l'ADNc sont largement méconnus. Chez la femme enceinte, de l'ADNc fœtal peut être isolé dans le plasma. Après l'accouchement, la demi-vie d'ADNc fœtal a été estimée entre 4 et 30 minutes dans le plasma maternel (50). Des travaux montrent un modèle d'élimination en 2 phases, avec une première phase rapide avec une demi-vie d'1H puis une seconde phase avec une demi-vie de 13H (51). Au total, l'ADNc fœtal disparaît entre 1 et 2 jours après la césarienne.

Les travaux dans le champ de la cancérologie sont assez limités. Plusieurs travaux se sont intéressés à l'impact pronostique de la persistance d'ADNc après chirurgie mais peu de travaux ont investigué la cinétique d'élimination de l'ADNc après chirurgie d'un cancer localisé. Dans un modèle de cancer naso-pharyngé induit par l'Epstein Barr Virus (EBV), le suivi plasmatique de marqueurs du virus présents dans l'ADN tumoral après chirurgie montrent une demi-vie de 139 minutes (52). Dans un modèle de cancer du côlon opéré, la demi-vie de l'ADNc tumoral était estimée à 114 minutes (53). Cette demi-vie est relativement courte puisque l'on considère qu'en 5 demi vies, un biomarqueur est totalement éliminé. L'ADNc est donc un biomarqueur reflétant la maladie quasiment en temps réel.

La voie d'élimination semble principalement rénale. Dès les années 2000, des séquences d'ADN spécifiquement masculines sont détectées dans l'urine de sujets féminins transfusés avec du sang provenant d'un sujet masculin (54). Plus récemment, de l'ADN fœtal a été identifié dans les urines de 5 femmes sur les 7 testées, lors du 3^{ième} trimestre de la grossesse avec une fraction estimée entre 1,92% to 4,73% (55). Enfin il a été démontré la faisabilité de détecter dans les urines des mutations spécifiques de l'*EGFR* chez des patients traités pour un cancer du poumon et recevant un inhibiteur de l'*EGFR* (56).

3. Aspects technologiques.

3.1. Eléments pré-analytiques.

La fraction d'ADNct dans l'ADNc est variable en fonction du stade de la maladie, du type tumoral et peut représenter une très faible fraction. Il apparaît donc primordial de minimiser la fraction d'ADNc non tumoral dans l'échantillon car elle peut augmenter le bruit de fond et *in fine* diminuer la sensibilité de détection d'une anomalie présente dans l'ADNct.

Les éléments pré-analytiques à prendre en compte comprennent le mode de prélèvement sanguin utilisé, le type de tube, ses modalités de stockage et de transport. De nombreux travaux se sont attachés à optimiser l'ensemble des prérequis pré-analytiques. Récemment, l'ASCO a émis des recommandations spécifiques (57).

3.1.1. Sérum versus plasma.

Le premier paramètre à prendre en considération est la fraction du sang à partir de laquelle l'ADNc peut être extrait de façon optimale. L'ADNc doit être extrait préférentiellement à partir du plasma par rapport au sérum. Pour un même échantillon de sang total, la nature et la quantité d'ADNc sont très différentes entre ces 2 fractions : le sérum contient des molécules d'ADNc de plus haut poids moléculaire (150 à 2000 pdb contre 155 pdb pour le plasma), probablement produites par la lyse et l'apoptose des leucocytes lors de la coagulation de l'échantillon qui est un processus biologique relativement « agressif » (58). Ainsi, l'extraction de l'ADNc à partir du plasma en comparaison au sérum minimise la contamination de l'ADNct par de l'ADN génomique provenant des leucocytes (59).

3.1.2. Type de tube à utiliser pour le prélèvement et modalités de stockage.

Le deuxième paramètre à considérer est le type d'anticoagulant présent dans le tube à partir duquel le plasma est isolé.

Trois anticoagulants sont couramment utilisés pour l'extraction du plasma : l'acide éthylène diamine tétra-acétique (K2EDTA), les sels d'héparines ou le citrate de sodium. Les quantités d'ADNc recouvrées sont identiques avec ces 3 anticoagulants si le prélèvement est pris en charge moins de 6 heures après le prélèvement mais l'EDTA, anticoagulant n'inhibant pas les réactions de PCR, doit être préféré pour les applications ultérieures (60).

Des tubes spécifiques contenant des agents fixateurs ont été développés : Streck Cell-Free DNA BCT (Streck), PreAnalytiX PAXgene Blood ccfDNA Tube (PAXgene), Roche Cell-Free DNA Collection Tube (Ariosa), Cell-Save Preservative Tube (Janssen Diagnostics) et Biomatrix LBgard® Blood Tube (LBgard). Ils préviennent la lyse cellulaire pendant plusieurs jours à température ambiante (61, 62) mais avec un coût par tube plus élevé. La composition exacte de chacun de ces tubes est inconnue.

L'ensemble des études montrent que pour un tube EDTA, plus le délai entre le prélèvement et l'isolement du plasma augmente, plus la quantité d'ADNc extraite augmente. Ce phénomène n'est pas observé pour les tubes commerciaux précités pour des conditions de conservation à 25°C jusqu'à 14 jours. Une récente étude a montré que la prise en charge d'un prélèvement dans un tube *Cell-Free DNA BCT* à température ambiante ou dans un tube EDTA qui était stocké à 4°C moins de 24h permettait d'isoler des quantités d'ADNc identiques (63). Les données comparant chacun des tubes commerciaux sont nombreuses. Le tube Streck Cell-Free DNA BCT permettrait une meilleure prévention de lyse cellulaire pour un échantillon stocké à température ambiante par rapport au tube PAXgene (61). Une étude récente semble montrer que le tube Biomatrix LBgard® Blood Tube (LBgard) permet de garantir une meilleure conservation de l'ADNc pour des conditions extrêmes de conservation à 37°C par comparaison aux tubes précités (64).

En conclusion, un tube simple EDTA est utilisable si le prélèvement est stocké à 4°C et rapidement techniqué, habituellement en moins de 3 à 4h suivant le prélèvement. Les tubes spécifiques présentent un intérêt manifeste si l'échantillon doit être envoyé à l'extérieur pour être analysé, particulièrement dans le cadre d'essais thérapeutiques multicentriques avec une analyse centralisée.

3.1.3. Centrifugation.

Il n'existe à l'heure actuelle aucun protocole standard de centrifugations des échantillons. Celle-ci doit s'effectuer dans une centrifugeuse à rotor mobile pour diminuer les risques de lyse des leucocytes lors de la centrifugation et la décélération doit s'effectuer sans freinage brutal. Un protocole de 2 centrifugations successives est souvent utilisé avec une première centrifugation à basse vitesse pour limiter la lyse des leucocytes puis une deuxième centrifugation à haute vitesse.

3.1.4. Stockage.

Le plasma isolé peut être stocké à -80°C avant l'extraction de l'ADNc. Il est recommandé de réaliser des aliquots à usage unique pour limiter les cycles de congélation-décongélation qui peuvent altérer les acides nucléiques

3.1.5. Méthodes d'extraction de l'ADNc.

Il existe de nombreux kits commerciaux d'extraction de l'ADNc (Tableau 2). Les paramètres importants à considérer sont la méthode d'extraction utilisée, le volume d'échantillon à partir duquel l'extraction peut être réalisée, le volume d'élution, le rendement d'extraction, la qualité et la pureté de l'ADNc et la capacité d'automatisation et le temps de manipulation. Schématiquement, il s'agit d'éliminer les lipides membranaires et les débris cellulaires du plasma à l'aide de détergents et de centrifugations, d'éliminer les protéines à l'aide de protéases et de façon optionnelle d'éliminer les ARN à l'aide de RNase. A l'issue de ces étapes, l'ADNc est précipité puis élué. Certains kits ajoutent une étape initiale de lyse cellulaire qui peut être problématique en cas de persistance de leucocytes dans le plasma.

La première méthode d'extraction repose sur l'adsorption des molécules d'ADN à l'aide de silice. C'est une méthode largement utilisée dans les kits courants. L'ADN est adsorbé spécifiquement sur la membrane/bille/particule de silice en présence de certains sels et à un pH particulier. Les contaminants cellulaires sont éliminés par les différentes étapes de lavage. L'ADNc est finalement élué dans un tampon faible en sel ou tampon d'élution. Des sels chaotropes sont inclus pour aider à la dénaturation de protéines et l'extraction d'ADN. Les avantages de cette méthode sont la possibilité d'être incorporée dans des colonnes de

centrifugation ou des micro-puces et son bon rendement d'extraction. Il s'agit d'une procédure plus simple et plus rapide que l'extraction organique et adaptée pour l'automatisation. Les kits basés sur cette méthode comprennent notamment le QIAamp Circulating Nucleic Acid kit.

La méthode de séparation magnétique est aussi largement utilisée. Cette méthode est basée sur la liaison réversible de l'ADN à une surface solide/bille/ particule magnétique recouverte par un anticorps liant l'ADN ou un groupe fonctionnel interagissant spécifiquement avec l'ADN. Après liaison de l'ADN, les billes sont séparées des autres composants cellulaires contaminants, lavées et finalement l'ADNc purifié est élué par extraction à l'éthanol. Son avantage principal est sa rapidité et son caractère automatisable.

Tableau 2. Principaux kits commercialisés.

Nom du kit	Société	Technologie	Volume de plasma initial	Volume d'éluion
QIamp Circulating Nucleic Acid kit	Qiagen	Silice	1 à 5 ml	20 à 150 µl
MagMAX Cell-Free DNA Isolation Kit	Thermofisher	Billes magnétiques	500 µl à 10 ml	15 à 50 µl
Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit	Promega	Billes magnétiques	200 µl à 1 ml	60 µl
Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit	NorgenBiotech	Polymères	10 µl à 10 ml	50 à 100 µl
EpiQuik™ Circulating Cell-Free DNA (cfDNA) Isolation Easy Kit	Epigentek	Polymères	20 µl	8-18 µl
chemagic cfNA 5k Kit special H24	PerkinElmer	Billes magnétiques	2 à 5 ml	100 µl
NextPrep-Mag™ cfDNA Isolation Kit	Bioo Scientific	Billes magnétiques	1 à 5 ml	12 µl/ml de plasma
NucleoSnap DNA Plasma	Macherey Nagel	Silice	1 à 5 ml	20 à 50 µl
ZR Serum DNA kit	Zymo Research	Polymères	1 à 5 ml	10 à 20 µl
PME Free-Circulating DNA extraction kit	Analytik Jena	Polymères	1 à 5 ml	30 µl
NucleoSpin DNA Plasma midi	Clontech	Silice	1 à 5 ml	200 µl
Chemagic Circulating NA kit	Chemagen	Billes magnétiques	2 à 5 ml	60 à 50 µl

De nombreuses études se sont attachées à décrire les rendements d'extraction de l'ADNct (65, 66). Néanmoins au-delà de la quantité d'ADNc extraite, la capacité de ces kits à isoler les fragments de petites tailles est à prendre en compte. En effet, l'ADNct est souvent très dégradé les kits doivent être capable de récupérer de fragments de petite taille.

La comparaison de 4 kits (QIAamp DNA blood mini kit, QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit Qiagen, NucleoSpin Plasma XS kit, Macherey-Nagel and FitAmp Plasma/Serum DNA Isolation kit Epigentek) par des méthodes d'enrichissement en ADN et une validation par qPCR et séquençage ciblé illustre la variabilité de ces kits en termes de concentrations d'ADNct extrait et de taille des fragments (67). Les kits Qiagen permettaient de recueillir des concentrations

d'ADNc 10 fois plus élevées que les 2 autres kits testés. Une autre étude ayant comparé onze différentes méthodes d'extraction et 3 méthodes de quantification démontre que le kit Qiagen CNA kit et Norgen Plasma/Serum Circulating DNA sont les plus performants en termes de rendement d'extraction (68). Néanmoins, le kit QUIamp Circulating Nucleic Acid kit qui est probablement le plus utilisé dans les laboratoires semble moins performant que le kit NucleoSnap pour l'extraction des fragments de petite taille (69).

3.1.6. Méthodes de quantification de l'ADNc.

La méthode de quantification de l'ADNc est une source potentielle de variabilité. La méthode traditionnelle de type spectroscopie aux ultraviolet (UV) est inadaptée compte tenu des faibles concentrations d'ADNc dans le plasma. Les méthodes de spectrophotométrie à la fluorescence en utilisant des agents intercalants sont des méthodes plus précises et plus sensibles. Pour ces raisons, les méthodes PicoGreen (Thermo Fisher) ou Qubit assays (Thermo Fisher) sont les plus utilisées. La qPCR est aussi utilisée mais son efficacité est dépendante des gènes cibles.

3.1.7. Conclusion

De nombreux facteurs affectent les concentrations d'ADNc et sa fragmentation. Les principales recommandations pré analytiques sont reprises sur la figure 7.

Figure 7 : Recommandations pré analytiques pour l'extraction de l'ADNc.

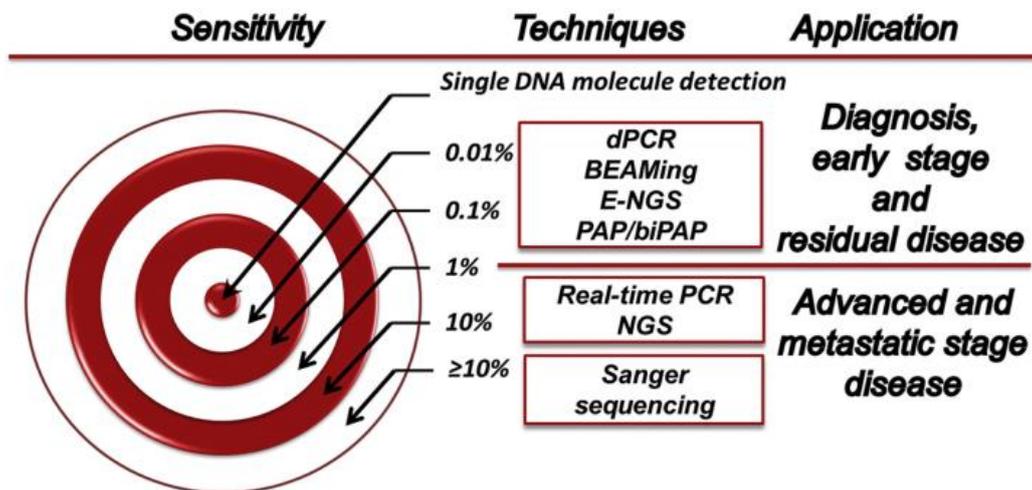
<p>Prise de sang</p>  <p>Tubes EDTA traités en moins de 3h ou utilisation d'un tube avec agent stabilisant</p>	<p>Extraction du plasma</p>  <p>1^{ère} étape à basse vitesse puis 2nde centrifugation à haute vitesse</p>	<p>Stockage du plasma</p> 	<p>Extraction de l'ADNc</p>  <p>Utilisation de kits spécifiques développés pour l'ADNc</p>
---	--	--	---

3.2. Approches méthodologiques.

Quelle que soit l'approche technologique, la détection de l'ADNct repose sur l'identification d'anomalies spécifiques des tumeurs permettant de le distinguer de l'ADN normal. Ces anomalies spécifiques comprennent des anomalies de séquence (variant nucléotidique, délétion, insertion, fusion) ou des modifications épigénétiques (méthylation). Elles peuvent être situées sur n'importe quelle région du génome même si les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur sont localisés des régions d'intérêt particulier.

On distingue deux types d'approche : i) les approches ciblées avec une haute sensibilité mais qui détectent souvent une seule mutation dans une région cible ii) des approches non ciblées qui interrogent des régions du génome plus larges mais avec une sensibilité moindre (Figure 8).

Figure 8 : Principales techniques d'analyse de l'ADNc. Adapté de Riva et al (70).



3.2.1. Approche sur un locus unique.

Les techniques de type PCR spécifique d'allèle ont été utilisées depuis les années 2000 pour la détection de mutations spécifiques dans l'ADNct. Elles permettent la détection de variants nucléotidiques (SNV) avec une sensibilité de 5 à 10% de fréquence allélique.

L'augmentation de la sensibilité de cette technique repose sur i) le développement d'ADN polymérase de plus en plus fiables ii) l'augmentation du nombre de molécules d'ADNct pour chaque réaction iii) des approches digitales. On peut citer les techniques CAST-PCR, COLD-PCR qui visent à favoriser l'amplification des variants recherchés.

Les approches de type PCR digitale se sont beaucoup développées (71). Elles permettent de détecter et de quantifier une séquence d'acide nucléique donnée (mutée par exemple) même si elle est diluée au sein de nombreuses séquences sauvages. La technique consiste à réaliser une réaction de PCR, non plus sur un mélange d'ADNc cibles, mais sur des ADNc cibles individuels, compartimentés par dilution limite de l'échantillon initial et à compter le nombre de partitions dans lesquelles une réaction a lieu. Elle permet ainsi une quantification de la séquence recherchée et détermine une fréquence allélique. Les techniques de PCR digitale basée sur des plateformes micro-fluidiques ont permis d'augmenter la sensibilité entre 0,01% et 0,1% (1 copie mutée dans 1000 à 10000 copies normales) sous réserve d'un nombre suffisant d'ADNct lors de la réaction. La PCR digitale et ses variantes droplet-dPCR et BEAMING (Beads, Emulsion, Amplification, Magnetic) peuvent être considérées comme la méthodologie standard de détection de mutations ciblées dans l'ADNct. La limite principale de ces approches est la difficulté de multiplexage des tests et la recherche ciblée d'anomalie connue *à priori*.

3.2.2. Approche de séquençage ciblé.

Par opposition aux techniques précédentes, les approches de séquençage permettent une approche plus large, sans connaissance *à priori* de l'anomalie génétique à rechercher. La sensibilité avoisine 1% mais l'usage de techniques d'optimisation permet d'atteindre 0,1%. Deux types d'approches sont utilisés. Dans le séquençage des amplicons, ces derniers sont générés par PCR, poolés puis finalement séquencés. Le séquençage ciblé à haut débit permet une excellente couverture d'une région d'intérêt spécifique, ainsi le séquençage d'amplicons offre une détection très sensible des variants. Le procédé permet le multiplexage des échantillons dans

lesquels il est possible de déterminer des centaines de séquences de fragments de PCR en même temps.

La deuxième approche est le séquençage par capture d'hybride. Le principe de capture d'hybrides est fondé sur l'hybridation d'une sélection de fragments d'ADN représentant les régions génomiques cibles avec l'échantillon d'ADN à enrichir. Il existe deux méthodes pour réaliser cet enrichissement par capture : sur support solide ou en solution.

Les approches NGS ne sont pas toujours capables de détecter des mutations à des fréquences alléliques rares et plusieurs stratégies ont été développées. Les premières visent à augmenter la couverture des régions séquencées (>10000X) (72, 73). Une autre approche consiste à optimiser le taux de détection par des méthodes bio-informatiques comme la méthode BPER (*Base-Position Error Rate*) développée par Pecuchet et al (74). Par une méthode de NGS, le taux d'erreur de séquençage sur une base donnée est déterminé dans un échantillon d'individus sains. Pour un patient donné, pour chaque position donnée, la fréquence allélique minimale d'une mutation potentielle est ainsi statistiquement comparée au taux d'erreur déterminé précédemment. Si elle est significativement plus élevée, le variant est donc retenu comme significatif permettant avec cette méthode un seuil de détection de 0,003% de fréquence allélique pour les SNV et de 0,001% pour les insertions ou les délétions.

La méthode CaPP-seq (*Cancer personalized profiling by deep sequencing*) développée par Dieh et al s'est particulièrement développée (75). L'étape cruciale de ce protocole est le design de sélecteurs biotinylés qui sont complémentaires de régions porteurs de mutations récurrentes préalablement sélectionnées. Après hybridation, les « sélecteurs » sur les régions d'intérêt sont purifiés et amplifiés. Dans les cancers du poumon, cette méthode a pu identifier des mutations dans 95% des patients avec une spécificité de 96% pour des fréquences alléliques pouvant aller jusqu'à 0,02% (75). Le coût est estimé environ à 200 euros par échantillon.

La méthode "*targeted error correction sequencing*" ou TEC-Seq implique elle aussi la capture d'hybride en solution d'un panel de gènes prédéterminés et un séquençage à une profondeur de 30000 X. Par cette méthode, et grâce à un panel de 58 gènes en lien avec le cancer, l'équipe de Phallen a démontré un seuil de détection de 0,05% et une spécificité de près de 100% (76). Dans un échantillon de cancers variés, cette technologie a détecté de l'ADNct chez 56% des patients avec un cancer du sein (stade I, II), 71% des patients avec un cancer colorectal de stade précoce et 57% et 56% des patients avec un cancer bronchique et de l'ovaire respectivement. Ces approches sont utilisées en routine mais avec un coût supérieur et un délai de rendu de résultat plus long.

3.2.3. Séquençage d'exomes et approches de type génome entier.

Le premier séquençage d'exome entier à partir de l'ADNc a été rapporté en 2013 (77). L'équipe de Murtaza a suivi 6 patients avec différents types tumoraux et a réalisé le séquençage de l'ADNc à des temps variés au cours de l'évolution de la maladie et des traitements. Cette approche pose encore des problèmes de coût et de compatibilité avec la routine clinique.

La détection d'amplifications ou de délétions dans l'ADNct est possible par des approches de séquençage de génome entier à faible couverture *via* l'analyse quantitative du nombre de fragments séquencés pour une zone donnée et sa comparaison par rapport à un témoin. Ces variations du nombre de copies de gènes ou de régions chromosomiques sont présentes dans plus de 90% des tumeurs. Une des premières études a utilisé une technologie de type Affymetrix pour l'analyse du plasma de patientes suivies pour un cancer du sein (78). Dans cette étude, l'équipe de Shaw a détecté à partir de l'ADNc de hauts niveaux d'amplification de gènes, présents dans la tumeur et détectables chez certains patients jusqu'à 12 ans après le diagnostic initial malgré l'absence d'évidence de signe de récurrence. D'autres approches de types séquençage de masse ont été publiées (79, 80). La limitation majeure de cette approche reste la sensibilité puisque l'analyse d'échantillons comportant moins de 5 à 10% d'ADNct ne donne pas de résultats suffisamment informatifs. Un groupe du MIT de Harvard a ainsi développé une approche en 2 étapes (81). La première étape consiste à estimer la fraction tumorale d'ADNct par un séquençage du génome entier à une profondeur de 0,1X à l'aide d'un procédé bio-informatique appelé *ichor CNA*. Ce procédé est basé sur l'étude des variations du nombre de copies d'un segment d'ADN donné. Les échantillons dont le contenu en ADNct était supérieur à 10% étaient ensuite séquencés à une profondeur moyenne de 191X. L'analyse de 1439 échantillons provenant de 520 patients suivis pour un cancer du sein ou de prostate a montré que 34% des patients avaient un contenu en ADNct supérieur à 10%. Le séquençage du génome entier de l'ADNc tumoral et de l'ADNc de 41 patients a montré une concordance de 88% pour les mutations ponctuelles, de 80% pour les variations du nombre de copie de gène.

3.2.4. Principaux kits commerciaux développés pour l'analyse de l'ADNct.

Tableau 3. Tests commerciaux développés pour l'analyse de l'ADNc en oncologie.

Compagnie	Nom	Technologie	Nombre de gènes testés
Foundation Medicine	FoundationACT	Séquençage	61
Guardant Health	Guardant360	Séquençage	73
Personal Genomic Dx	PlasmaSELECT R64	Séquençage	64
Neogenomics	NeoLAB	Séquençage	48
Genomic Health	Oncotype SEQ	Séquençage	17
Biocept	Target Selector	PCR	Variable en fonction du kit
Archer Dx	Reveal	Séquençage	28
ThermoFisher	Oncomine ctDNA	Séquençage	11
Roche	AVENIO	Séquençage	17
Natera	Signatera	Séquençage	Personnalisé
OncoDNA	OncoSELECT/ TRACE	Séquençage	Personnalisé
Siemens / NEO New Oncology	NEOliquid	Séquençage	39
BGI	SENTIS Lung Cancer	Séquençage	11
AmoyDx	Super-ARMS EGFR	PCR	1
Cobas	Cobas® EGFR Mutation Test v2	PCR	1
ACT Genomics	ACTMonitor Lung Breast Colon Gastric 50 gene	NGS	11 8 13 10 50

4. Applications cliniques de l'analyse de l'ADNct en cancérologie : état des lieux.

4.1. Médecine théranostique : identification de cibles thérapeutiques et de mécanismes de résistance aux traitements.

Le terme théranostic (ou théragnostic) est un néologisme qui dérive de la contraction des termes « thérapeutique » et « diagnostic » ; c'est l'utilisation d'un test diagnostique, identifiant un marqueur, pour orienter la thérapeutique du patient en fonction de son statut pour le marqueur (statut positif ou négatif pour un marqueur binaire).

4.1.1. Identification des déterminants génomiques d'une réponse à une thérapie.

L'illustration principale de cette application directe de l'ADNct est l'analyse des mutations de l'*EGFR* des cancers bronchiques. Le développement des inhibiteurs de l'*EGFR* dans le sous-groupe des adénocarcinomes *EGFR* mutés a modifié profondément la prise en charge et le pronostic de ces patients. Pourtant la détermination du statut *EGFR* sur la tumeur primitive n'est pas toujours aisée compte tenu de l'exiguïté fréquente des prélèvements obtenus.

L'agence européenne du médicament a approuvé une méthode de détection des mutations *EGFR* basé sur l'ADNct pour guider la prescription des inhibiteurs de l'*EGFR* (gefitinib, l'erlotinib et osimertinib) en cas d'impossibilité d'analyser du tissu tumoral (82-84). Un test est approuvé par la FDA : cobas *EGFR* Mutation Test v2 (Roche Molecular Systems, Inc) (85). Les recommandations stipulent qu'en cas de résultat négatif sur l'ADNct, une biopsie tumorale est recommandée compte tenu de l'impact thérapeutique. Ces autorisations sont fondées sur plusieurs essais thérapeutiques. Pour l'erlotinib, l'essai de phase III Ensure a comparé l'erlotinib à la chimiothérapie pour des patients dont la tumeur présentait une délétion de l'exon 18 de l'*EGFR* ou une mutation L858R (86). La détermination du statut *EGFR* a été réalisée rétrospectivement sur l'ADNct sur des prélèvements collectés durant l'essai thérapeutique. Deux éléments ont été pris en compte pour assurer la validité clinique de cette approche : i) la comparaison des taux de survie sans progression avec un hazard ratio (HR) de 0,34 [0,21-0,54] en faveur de l'erlotinib dans les groupes des patients mutés *EGFR* sur tissu et un HR= 0,29 [0,19-0,45] pour les patients dont la mutation était recherchée dans le plasma ; ii) des analyses de corrélation du test plasma/tissu avec une positivité du test sanguin dans

76,6% lorsque le test sur tumeur était positif et une négativité dans 98,2% lorsque le test tumoral était négatif (87)

Le même type d'analyse a été conduit pour osimertinib, spécifiquement actif pour les patients présentant une mutation de l'*EGFR* T790M à partir des essais AURA1 et AURA2 (88). Les taux de réponse étaient identiques 61% pour les patients avec une mutation T790M déterminée sur la tumeur (128/210) ou le plasma (72/117). Dans 58% des cas, si la tumeur était positive pour la mutation, le test sanguin était positif. Dans 80% des cas, si la tumeur était négative, le test sanguin était négatif. En revanche, une analyse *post-hoc* portant sur 18 patients avec une mutation T790M détectée uniquement dans le plasma et pas dans la tumeur semble montrer une moindre efficacité de l'osimertinib comparé au patients pour lesquels la mutation était détectée dans le plasma et le tissu tumoral (89). Le même type d'analyse a été conduit avec le gefitinib, un troisième inhibiteur de l'*EGFR* (90).

D'autres test ont été développés dans d'autres types tumoraux portant sur des gènes comme *BRAF*, *ESR1* ou *PIK3CA*. On peut citer le travail de l'équipe d'Alain Thierry sur *KRAS* et *BRAF* dans les cancer colorectaux (91). La présence d'une mutation de *KRAS* est une contre-indication à l'utilisation d'un inhibiteur de l'*EGFR* tels que le cetuximab ou le panitumumab. Dans une étude prospective, ils ont démontré que le test sanguin pour la détection de 7 mutations de *KRAS* avait une sensibilité de 92% et une spécificité de 98% avec une concordance de 96% avec le tissu tumoral.

La validité clinique de ces tests reste encore à démontrer puisqu'à ce jour, les inhibiteurs de l'*EGFR* sont les seules thérapies dont la prescription peut être réalisée sur les résultats d'un test compagnon basée sur l'ADNct.

4.1.2. Identification des mécanismes de résistance à une thérapie.

Le développement des thérapies ciblées a permis d'observer des réponses tumorales parfois exceptionnelles. Pourtant, l'échappement tumoral reste une règle quasi intangible de la maladie métastatique et l'élucidation des mécanismes de résistance en cause est un vrai défi. Les analyses basées sur l'ADNc comportent plusieurs avantages théoriques. L'accès au tissu tumoral pré-exposé à un traitement est souvent difficile d'un point de vue éthique chez des patients en contexte de maladie avancé. De plus, l'hétérogénéité tumorale est souvent la règle et la biopsie tumorale est souvent mal représentative du tissu tumoral dans son ensemble. Plusieurs exemples illustrent le potentiel de l'analyse de l'ADNct.

Comme évoqué précédemment, les mutations de KRAS dans les cancers colorectaux sont un mécanisme de résistance primaire aux inhibiteurs de l'EGFR. Les travaux de l'équipe de Bardelli ont démontré qu'il s'agissait aussi d'un mécanisme de résistance acquis, détectable dans l'ADNct de patients exposés aux inhibiteurs de l'EGFR (92). L'apparition de la mutation de KRAS dans l'ADNct pouvait être détectée jusqu'à 10 mois avant la progression radiologique. Le même type de travaux menés par l'équipe de Diaz chez 28 patients a montré l'apparition de mutations KRAS dans l'ADNct chez environ 40 des patients considérés initialement comme KRAS sauvage et traités par un inhibiteur de l'EGFR (93). La mutation apparaissait en moyenne 5 mois après le début du traitement.

Dans les cancers du sein, des mutations récurrentes du gène *Estrogen Receptor 1* (*ESR1*) ont été identifiées chez des patientes préalablement exposés aux inhibiteurs de l'aromatase (94). Ces mutations sont acquises, « hot spot », avec 4 mutations (D538G, Y537S/N/C) représentant plus de 75% des mutations décrites (95). Elle entraîne une activation constitutive du récepteur en l'absence de ligand, pouvant expliquer l'échappement tumoral aux stratégies de privation estrogénique. La fréquence de ces mutations a été jusqu'à présent largement sous-estimée, les analyses tumorales portant le plus souvent sur du tissu tumoral non exposé à la thérapeutique.

La première démonstration de l'intérêt de la détection de la mutation de l'*ESR1* dans l'ADNct a été faite par l'équipe de N Turner (96). Dans une série de 171 patientes traitées pour un cancer du sein métastatique et ayant reçu des inhibiteurs de l'aromatase, cette mutation était détectée chez 36% des patientes ayant reçu les inhibiteurs de l'aromatase en contexte métastatique. L'efficacité des lignes de traitements ultérieures à base d'inhibiteur de l'aromatase était moins bonne pour les patientes présentant la mutation *ESR1*. La présence de la mutation *ESR1* dans l'ADNct est aussi un facteur indépendant de mauvais pronostic (97). Des analyses similaires ont été conduites à partir de l'essai BOLERO2. Dans cet essai thérapeutique qui a inclus des patientes résistantes à l'hormonothérapie, la fréquence de mutation d'*ESR1* était de 5% pour les analyses portant sur de la tumeur initiale contre plus de 15% pour les analyses portant sur du tissu métastatique (98). Les analyses de la même étude portant cette fois sur de l'ADNct ont montré que 28% des patientes à leur entrée dans l'étude avaient une mutation du gène *ESR1* détectable dans l'ADNct (99). D'autres analyses chez des patientes résistantes à l'hormonothérapie ont identifié des taux encore plus élevés jusqu'à 39% dans une population multi-traitée (100). Ce mécanisme de résistance, fréquent, situé sur un exon précis du gène, fait l'objet de nombreux développements thérapeutiques dont une nouvelle classe de SERD (*selective estrogen receptor degrader*) potentiellement actif chez les patientes mutées *ESR1*. On peut affirmer que c'est l'essor des analyses sur ADNct qui a permis ces développements.

Les inhibiteurs de PARP font l'objet de nombreux développements en oncologie. Les patients avec une mutation ou un grand réarrangement somatique ou constitutionnel des gènes *BRCA1* ou *BRCA2* sont particulièrement sensibles à ces traitements et l'olaparib est une molécule approuvée dans le traitement des cancers ovariens et cancer du sein. Un des mécanismes potentiels de résistance à ce traitement est la restauration de la fonctionnalité de la protéine par l'acquisition d'une nouvelle mutation somatique du gène. Ce phénomène a été décrit dans les tumeurs dès 2008 et seuls des travaux portant sur quelques cas ont été rapportés (101-103). Des travaux très récents ont pu détecter ces mécanismes de résistance sur l'ADNct de patients et ouvrent de nombreuses perspectives (104-106).

Enfin, au-delà de l'identification d'une mutation spécifique, prédictive de l'apparition d'une résistance à un traitement donné, les analyses de l'ADNct permettent la caractérisation de sous clones ayant un rôle potentiellement important dans la résistance au traitement et l'évolution métastatique. Il est ainsi possible d'établir de véritables arbres phylogénétiques à partir de l'ADNct, modélisant l'apparition et l'évolution des différents sous clones qui ont conduit à la résistance à la thérapeutique et *in fine* à la rechute. L'équipe de C Swanton a démontré cette possibilité dans les cancers du poumons localisés (107).

4.2. Suivi de la réponse thérapeutique.

L'objectif du suivi thérapeutique en oncologie est double : i) stopper précocement un traitement potentiellement toxique, coûteux et inutile, ii) poursuivre un traitement générant une réponse anti-tumorale afin d'améliorer les symptômes et d'allonger la survie des patients. L'évaluation de la réponse n'est pas toujours aisée comme en témoigne le concept de pseudo-progression décrit en immuno-oncologie (108).

La demi-vie courte de l'ADNct et son accessibilité, permettent d'envisager son utilisation pour l'analyse en temps réel de la masse tumorale et de la réponse à une thérapeutique. Les travaux de Dawson en 2013 ont étudié les variations de l'ADNct, de marqueurs sériques (CA15.3) et les réponses scannographiques de 20 patientes traitées pour un cancer du sein métastatique par chimiothérapie (109). Pour 53% des patientes, l'augmentation des concentrations d'ADNc sous chimiothérapie était corrélée à une progression tumorale détectée en moyenne 5 mois avant la progression scannographique. L'étude PLACOLL a étudié l'impact des variations de concentration d'ADNc sur la réponse tumorale et la survie de 82 patients avec un cancer du côlon traités par une première ou une seconde ligne de

chimiothérapie (110). Trois groupes ont été définis selon les variations de concentration d'ADNc entre T0 et la 1^{ère} ou 2^{ème} cure de chimiothérapie. Une diminution de plus de 80% de la concentration en ADNc entre C1 et C2/3 permettait prédire un meilleur taux de réponse à la chimiothérapie à 6 cures (taux de réponse 47,1% vs 0%; P=0,03) et une meilleure survie sans progression (HR=0,13, IC95% [0,03-0,54], P=0,005).

Au-delà des variations quantitatives sous chimiothérapie, les variations des fréquences alléliques d'une mutation ciblée par un traitement spécifique semblent pouvoir définir une réponse moléculaire. La « réponse liquide » est un concept émergent, par analogie à la réponse pathologique. Les études ont montré que les variations dynamiques peuvent identifier des réponses à un traitement plus précocement que l'évaluation clinique ou scannographique.

Des travaux récents ont été réalisés à partir des échantillons de l'étude PALOMA3. Cette étude a testé l'ajout d'un inhibiteur de CDK4-6 (palbociclib) au fulvestrant chez des patientes ayant un cancer du sein métastatique et préalablement traitées par hormonothérapie (111). Parmi les 459 patients pour lesquelles un échantillon sanguin était disponible, 100 (22%) ont eu une mutation de *PIK3CA* identifiée dans le plasma et 73 avaient un échantillon disponible 15 jours après le début du traitement. En calculant un ratio d'ADNc défini comme le nombre de copie de mutant *PIK3CA* entre J0 et J15 post traitement, il est montré que tous les patients recevant le palbociclib ont un ratio inférieur 1 et donc une diminution de nombre de copies de l'allèle muté de *PIK3CA*. L'intensité de la diminution dans ce groupe était significativement corrélée à la survie sans progression.

Dans les cancers du poumon, la diminution de la fréquence allélique de mutations de l'*EGFR* est observée dès le 4^{ème} jour de traitement avec un inhibiteur de l'*EGFR* tel que l'erlotinib chez 95% des patients (112). Cette diminution est d'environ 13.5% au jour 4 pour atteindre en moyenne 63.5% au jour 14 et était directement corrélée au pourcentage de réduction tumorale. Le même type d'analyse a été conduit dans des cas de mélanomes présentant une mutation *BRAF V600E* recevant une combinaison inhibiteur de BRAF/MEK (113). L'augmentation de la fréquence allélique de la mutation *BRAF V600E* dans le plasma identifiait une progression tumorale avec une sensibilité de 70% et une spécificité de 100%.

4.3. Médecine pronostique.

La concentration d'ADNc est globalement corrélée avec la taille tumorale et le stade de la maladie (44). Des variations interindividuelles et selon le type tumoral sont néanmoins observées. Une faible vascularisation tumorale peut diminuer le relargage de l'ADNct dans le plasma ou à l'inverse, générer une hypoxie favorisant la mort cellulaire et le relargage d'ADNct. Les patients avec une tumeur cérébrale ont des concentrations statistiquement plus faibles d'ADNct que les autres types tumoraux.

Le rôle pronostique de l'ADNct est lié à sa représentation indirecte de la maladie résiduelle après un traitement à visée curative. Dans une cohorte de 55 patientes traitées pour un cancer du sein par chimiothérapie néo-adjuvante puis chirurgie, la détection d'ADNct dans un échantillon de plasma à l'issue de la séquence thérapeutique a permis de prédire efficacement une rechute métastatique (HR 25,1 ; IC, 4,08 à 130,5; log-rank $P < 0,0001$) (114) (Figure 9). La rechute était détectée en moyenne 7,9 mois avant la rechute clinique. La détection d'ADNct tumoral avant tout traitement n'était en revanche pas un facteur risque identifié de rechute.

Figure 9 : La détection de l'ADNct par ddPCR après le traitement à visée curative d'un cancer du sein prédit la survie sans progression. Adapté de Garcia-Murillas (114).

Figure A : Survie sans progression des patients selon la détection ou non d'ADNct par ddPCR dans le plasma juste après la chirurgie.

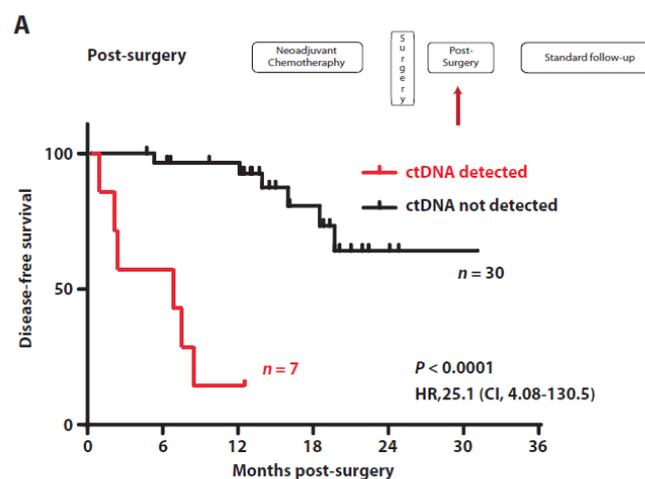


Fig. 4. Mutation tracking in serial plasma samples predicts early relapse. (A) Disease-free survival according to the detection of ctDNA in the first postsurgical plasma sample [HR, 25.1 (95% CI, 4.08 to 130.5)]. P value determined by log-rank test. Data are from $n = 37$ patients. **(B)**

Le même type d'analyse a été réalisé dans des cancers coliques par technique de BEAMING avec un seuil de détection des mutations dans l'ADNct de 0.01% (53). Parmi 20 patients opérés, 16 avaient des mutations dans l'ADNct détectables dans les 13 à 56 jours post-chirurgie. La quasi-totalité de ces patients a rechuté (15/16) par opposition aux 4 patients dont l'ADNct était devenu indétectable. L'ADNct était plus puissant que l'ACE pour prédire la récurrence. De nombreux travaux ont été réalisés dans le même contexte (115, 116).

La détection de la maladie résiduelle est un concept bien connu des hématologues notamment dans le suivi du transcrite de fusion BCR-ABL de la leucémie myéloïde chronique ou la détection de translocations t(14 ;18) ou t(11 ;14) dans les lymphomes folliculaires ou les lymphomes du manteau. A ce jour en oncologie solide et pour des maladies précoces, il n'existe pas d'intervention thérapeutique adaptée sur la détection d'une maladie résiduelle (MR). Pourtant, on pourrait imaginer de réaliser chez des patients MR+ une intensification de la thérapeutique ou une consolidation tandis que chez des patients MR-, une thérapeutique adjuvante moins agressive pourrait être mise en œuvre. Ces hypothèses biologiques nécessitent des confirmations par le biais d'essais thérapeutiques évaluant l'ADNct en oncologie solide comme marqueur de la maladie résiduelle.

4.4. Dépistage et détection précoce des cancers.

Le dépistage et le diagnostic précoce des cancers permettent de détecter des maladies à un stade plus précoce et en théorie d'augmenter le taux de guérison et *in fine* la survie des patients. Le succès d'un dispositif de dépistage repose sur la sensibilité de la méthode de dépistage et sa spécificité. Des tests basés sur la détection d'ADNct chez des individus sains sont donc envisageables.

Des travaux anciens ont montré la possibilité de détecter des mutations dans l'ADNc de sujets supposé sains (117). Dans cette cohorte prospective de sujets sains, des mutations de *KRAS* et *TP53* ont été mise en évidence chez 13/1098 (1,2%) et 20/550 (3,6%) des individus. Parmi ces patients, 16 ont développé un cancer dans un délai médian de 18 mois. Plus récemment, dans le cadre du diagnostic prénatal d'aneuploïdie fœtale basée sur l'ADNc fœtal, il a été mis en évidence chez 3 patients sur 4000, des profils génétiques aberrants ne pouvant être attribués à de l'ADN normal fœtal ou maternel (118). Ces anomalies ont conduit à des investigations médicales et conduit au diagnostic de cancer de l'ovaire, de lymphome folliculaire et de maladie de Hodgkin chez ces trois patientes.

L'exemple le plus récent et à plus grande échelle est celui du dépistage du carcinome naso-pharyngé par la détection du génome de l'Epstein-Bar virus (EBV) dans l'ADNct. Ce type tumoral est lié à l'infection par le virus EBV et l'ADNct portant les marques de l'intégration du génome de l'EBV est un marqueur diagnostique avec une sensibilité et une spécificité de 96% et 93% respectivement (119). Dans une cohorte de 20174 sujets asymptomatiques, les marques de l'EBV ont été détectées à 2 reprises à 4 semaines d'intervalle chez 309 sujets (1,5%) dans l'ADNc (120). Des investigations complémentaires ont été conduites chez 300 sujets (endoscopie naso-pharyngée plus ou moins IRM) et le diagnostic de carcinome naso-pharyngé a été finalement posé chez 34 patients. Par comparaison à des cohortes historiques, le diagnostic était posé à des stades plus précoces (71% versus 20%, $P < 0.001$). La sensibilité du test de dépistage était de 97,1% et la spécificité de 98,6%.

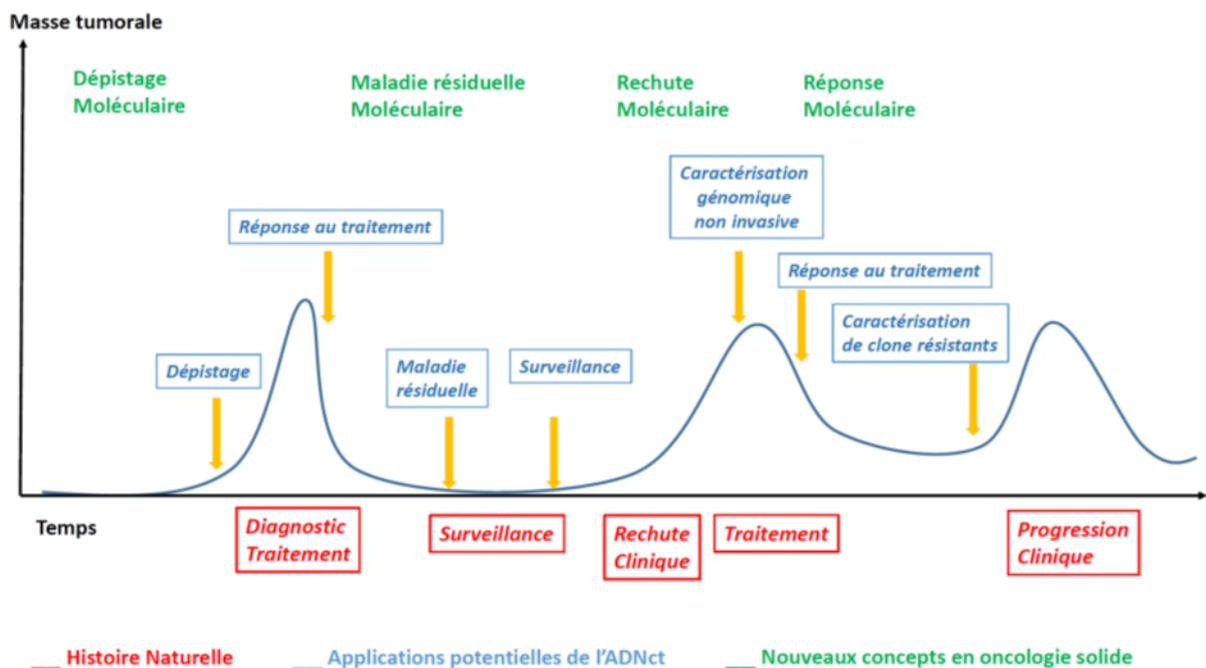
Ces approches, chez des individus supposés sains, pose la problématique des cas considérés comme faux positifs. En effet, 2 travaux récents illustrent cette question. Des mutations de *KRAS* ont été mises en évidence chez 7,4% et 14,8% de donneurs sains dans les exosomes et l'ADNc respectivement (121). Dans une série de 1059 patients asymptomatiques considérés comme à haut risque de cancer, des mutations dans l'ADNc ont été isolées chez 58 patients (principalement *GNAS* et *TP53*) (122). Parmi ces patients, 4 ont eu un diagnostic de cancer et 2 ont un diagnostic de cancer dans l'année qui a suivi. Le suivi s'est arrêté au bout d'un an. L'origine de ces mutations est mal connue, et la participation d'une hématoïèse clonale a été évoquée, particulièrement chez les patients de plus de 65 ans (123).

Récemment un test combinant la recherche de mutations dans l'ADNct et le dosage de protéine sérique a été évalué dans une population de 1005 patients avec 8 types de cancer localisés (124). Ce test était positif chez 70% des patients. De façon intéressante, ce test était capable de prédire la localisation tumorale dans 83% des cas. C'est une donnée importante puisque dans une optique de dépistage, pouvoir orienter à priori les investigations cliniques, pourrait augmenter le taux de détection de cancer et de réduire ainsi les faux positifs.

4.5. Conclusion.

L'analyse de l'ADNct peut donc être utile à tous les stades du cancer, du dépistage de la maladie jusqu'à la surveillance de la récurrence. Il permet en outre de mettre en œuvre des stratégies d'escalade thérapeutiques pour les patients à haut-risque et d'imaginer des stratégies de désescalade pour les patients identifiés à bas risque. L'ensemble des applications potentielles sont résumées sur la figure 10.

Figure 10 : Applications potentielles de l'ADNct en oncologie à tous les stades la maladie et concepts émergents. Adapté de Diehl, ASCO meeting 2017.



Résultats.

Suivi longitudinal des mutations détectées dans l'ADNct pour évaluer la réponse clonale à une thérapie ciblée. (Frenel et al, 2015).

Ce travail expérimental a été réalisé dans le laboratoire de recherche associé à l'unité de phase I du *Royal Marsden Hospital*. Ce service, dédié au développement de nouvelles drogues anti-cancéreuses, traite plus de 300 patients chaque année. Des premières administrations à l'homme sont réalisées ainsi que des essais d'association de drogues.

L'objectif principal d'un essai thérapeutique de phase I est la détermination de la sécurité d'administration et de la tolérance d'une nouvelle drogue afin d'établir la dose maximale tolérée et la dose recommandée pour un essai thérapeutique de phase II. Classiquement, la détermination de ces paramètres est réalisée selon des schémas d'escalade de dose avec des paliers progressifs guidés par le recueil de la toxicité. Malgré des succès thérapeutiques, le développement des anti-cancéreux reste un processus lent, coûteux avec un taux d'échec très élevé.

Ce schéma de développement a été profondément modifié ces dernières années compte tenu de l'essor de thérapies ciblées et de l'immuno-oncologie. En effet, la meilleure compréhension de la biologie tumorale associée au développement des capacités de séquençage a permis l'identification de plusieurs cibles thérapeutiques importantes en oncologie. Les progrès pharmacologiques ont permis l'élaboration de thérapies ciblant spécifiquement ces anomalies et à la mise sur le marché de drogues qui représentent de réelles avancées thérapeutiques. On peut citer les cancers bronchiques avec le ciblage EGFR, les mélanomes avec le ciblage BRAF ou le cancer du sein avec le ciblage HER2.

Cette transition d'un arsenal pharmacologique essentiellement cytotoxique vers un large panel de thérapies ciblées a permis le développement de biomarqueurs à visée théranostique. L'idée est de sélectionner *à priori* les patients sur la base d'anomalies moléculaires identifiées au préalable sur le tissu tumoral et dont on pense qu'elles augmentent la probabilité de répondre à la thérapie ciblée. Le but recherché est le développement accéléré de drogues dans des populations sélectionnées.

C'est dans ce contexte qu'a été développé le programme « Molecular Characterization » en 2011. Son but était la réalisation d'une caractérisation moléculaire de la tumeur pour chaque patient adressé pour un essai de phase I, et ce afin de l'orienter vers un essai thérapeutique adaptés aux cibles préalablement identifiées.

En parallèle de ce programme, l'approche ADNct a été mise en place de façon expérimentale. Pour chaque patient, du plasma était prélevé à chaque visite durant le traitement.

L'enjeu était double :

- 1) Pouvoir identifier par une simple prise de sang les cibles moléculaires identifiées au préalable dans le tissu tumoral et ainsi guider l'orientation vers un essai thérapeutique sur la base d'un test sanguin,
- 2) Déterminer des marqueurs de réponse précoces de réponse. En effet, l'évaluation de l'efficacité d'une drogue anticancéreuse en développement est basée sur le taux de réponse de cibles tumorales préalablement choisies. Cette réponse est souvent déterminée au 2^{ème} mois de traitement par imagerie scannographique. L'hypothèse de travail était que la possibilité de monitorer dans le sang, à des temps répétés, des anomalies moléculaires ciblées par une thérapie donnée, pourrait déterminer une « réponse thérapeutique moléculaire » potentiellement plus pertinente que l'évaluation du taux de réponse.

1. Caractéristiques de la population et sélection.

Il s'agit d'une population de patients adressés dans l'unité de phase I au *Royal Marsden Hospital (Sutton, Surrey, Royaume Uni)* entre Décembre 2012 et Mai 2014.

Les patients participant au programme de caractérisation moléculaire bénéficiaient d'un séquençage ciblé de tissu archivé ou d'une biopsie récente en utilisant la plateforme Miseq (Illumina) et étaient inclus dans la mesure du possible dans un essai thérapeutique, adapté à l'anomalie moléculaire identifiée. En parallèle, et après signature d'un consentement spécifique, 20ml de plasma était prélevé à l'initiation de la thérapie et tout le long du traitement jusqu'à progression.

Pour cette étude, nous avons sélectionnés les patients qui :

- Avaient une anomalie moléculaire identifiée sur la tumeur sur la plateforme Miseq (Illumina)
- Avaient reçu au moins 2 cycles du traitement à l'étude et avaient bénéficié d'une évaluation de l'efficacité du traitement.

Sur les 84 patients du programme de caractérisation moléculaire, 39 patients remplissaient ces critères. Le diagramme CONSORT (*Consolidating Standard of Reporting Trials*) est présenté figure 11.

Il s'agissait d'une population avec un cancer à un stade avancé, assez lourdement prétraitée avec un nombre médian de lignes de traitement de chimiothérapie de 2 (0-8). Les différentes caractéristiques des patients sont détaillées dans le tableau 4.

La thérapie allouée à chaque patient était dans la mesure du possible déterminée par le type de mutation détectée dans la tumeur. Cette étude a été proposée à tous les patients entrant dans un essai de phase I, en conséquence les traitements reçus sont très variés et reflètent les essais disponibles au moment de cette étude. Schématiquement, les thérapies ciblaient en majorité la voie PI3K-AKT-mTOR (n=28) et la voie MEK (n=7). La liste des traitement reçus est figurée dans le tableau 5.

Treize patients ont reçu une thérapie ciblant une anomalie moléculaire spécifique présente dans le tissu tumoral.

Figure 11. Diagramme CONSORT.

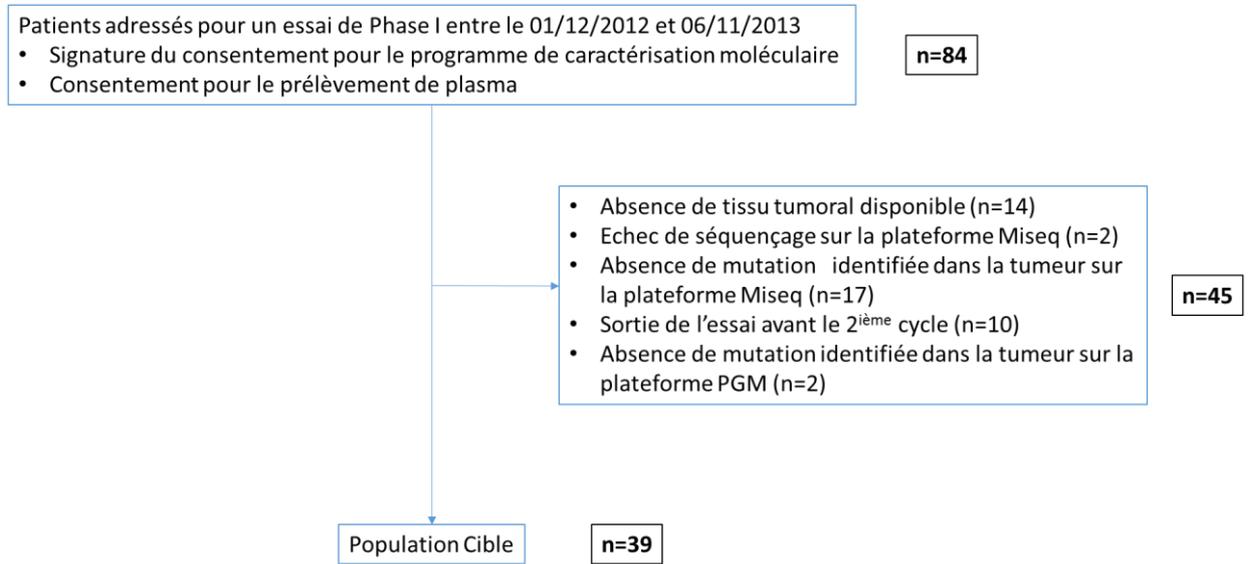


Tableau 4. Caractéristiques des patients inclus dans cette étude.

Caractéristiques des patients	
ECOG Performans Status	
0	17
1	22
Genre	
Homme	18
Femme	21
Histologie	
Colorectal	12
Ovaire	9
Sein	7
Vessie	3
Glioblastome	2
Cancer bronchique	2
Endomètre	1
Rein	1
Pénis	1
Mélanome	1
Traitements reçus antérieurement	
Chimiothérapie	38
Nombre de lignes	2 [0-8]
Radiothérapie	15
Hormonothérapie	4

Tableau 5. Types de traitement reçus par les patients et voies moléculaires ciblées.

Thérapies ciblées reçues	
Voie PI3K-AKT-mTOR	n
Inhibiteur de PI3K	10
Inhibiteur de PI3K + inhibiteur de MEK	4
Inhibiteur de mTOR	8
Inhibiteur de mTOR + Taxane	3
Inhibiteur d'AKT	3
Voie MEK	
Inhibiteur de MEK + inhibiteur d'IGF1R	5
MEK/RAF inhibiteur	2
Autres	
Inhibiteur de PARP	2
Inhibiteur de PIM kinase	2
Analogue de l'Acide oléique	2
Inhibiteur de récepteur aux androgènes	1
Inhibiteur de AGC kinase	1
Inhibiteur de l'acide folique	1

2. Extraction de l'ADN.

L'ADN tumoral a été extrait à partir de tissus conservés en paraffine ou de biopsies congelées incluses en paraffine après décongélation avec les kits commerciaux FFPE Tissue DNA kit (Qiagen). Les tumeurs étaient macro-disséquées pour avoir au minimum 70% de cellules tumorales.

Le sang total était collecté dans des tubes CPT (BD biosciences) (20ml) et le plasma isolé par centrifugation et congelé moins de 2h après le prélèvement sanguin.

L'ADN circulant a été extrait à partir de 2ml de plasma en utilisant le Snomag Circulating DNA kit (Snova biothechnologie) basé sur une technologie de billes magnétiques. La quantification de l'ADNc a été effectuée à l'aide du Quant-iT high sensitivity Picogreen double strand DNA (dsDNA) Assay Kit (Invitrogen).

3. Séquençage de l'ADN

3.1. Principes de la plateforme PGM

L'ADN tumoral initialement séquencé sur la plateforme Miseq Illumina, a été séquencé à nouveau sur la plateforme PGM. L'ADNct a été uniquement séquencé sur le séquenceur PGM.

Deux panels commerciaux validés ont été utilisés : *Ion Ampliseq Cancer Hotspot Panel v2* et *Ion Ampliseq Colon and Lung Cancers panels*. La liste des gènes et des régions ciblées est disponible en annexe 2-3.

Le *Ion Ampliseq Cancer Hotspot Panel v2* est un panel de gènes initialement développé pour séquencer de l'ADN génomique ou tumoral issu de tissu en paraffine. Il couvre 2800 mutations sur des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur annotées dans la base COSMIC. Le choix de la plateforme et de ce panel pour le développement du séquençage de l'ADNc a été dicté par :

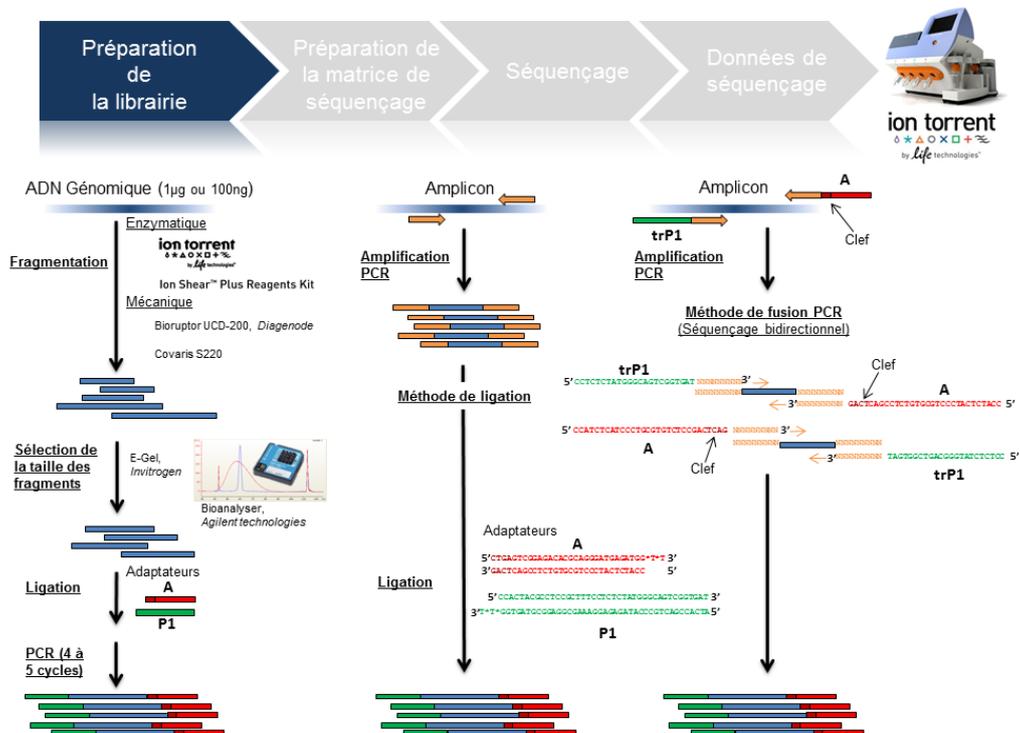
- la taille moyenne des amplicons du panel (111-187 pdb, moyenne 154 pdb) , compatible avec la dégradation de l'ADNc et la taille moyenne des fragments isolé dans le plasma
- la quantité d'ADN requise minimale de 10ng pour le séquençage, compatible avec les quantités d'ADNc identifiées chez les patients.

Le séquençage se déroule de la façon suivante.

1) Préparation de la librairie (Figure 12).

La finalité de la préparation de librairie pour le PGM Ion Torrent est de lier aux fragments d'ADN à séquencer un couple d'adaptateurs A et P1. Une première étape d'amplification est réalisée par PCR avec l'ADN cible et le pool de primer. Les produits de PCR sont partiellement digérés puis une étape de ligation d'un couple d'adaptateur est opérée. La librairie est purifiée et monitorée sur puce à ADN (Bioanalyzer, Agilent) avec comme objectifs de calculer la concentration et d'identifier la taille moyenne des fragments qui la composent. Ces valeurs permettront ainsi de déterminer la concentration molaire de la librairie et d'y appliquer le facteur de dilution nécessaire pour favoriser le ratio idéal 1/1 (Fragment ADN de la librairie/Ion Sphere Particle) pour l'étape suivante de PCR en émulsion. A l'issue de cette étape, plusieurs librairies sont mélangées après ajout d'un code barre à chaque librairie.

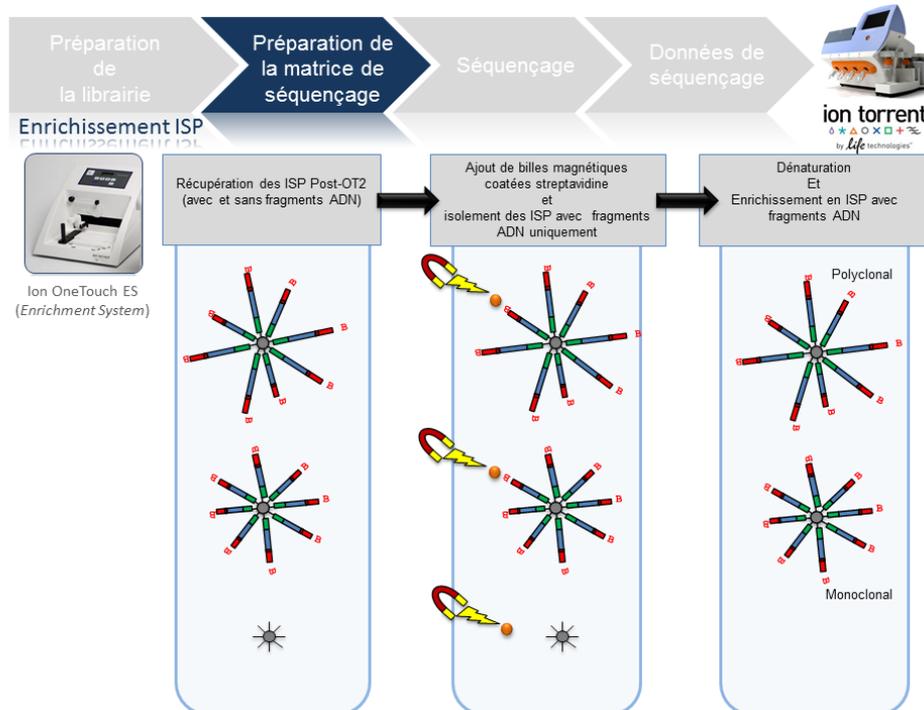
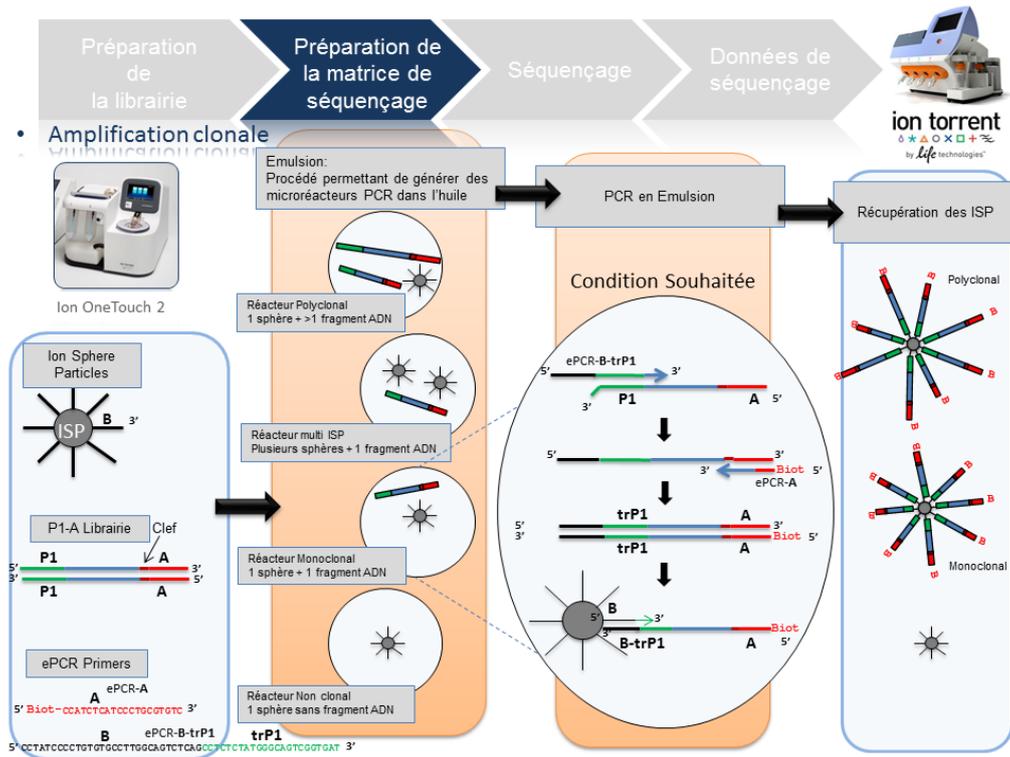
Figure 12. Préparation de la librairie avant séquençage sur le plateforme Ion Torrent. D'après <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/brands/ion-torrent.html>.



2) Préparation de la matrice de séquençage

Cette étape automatisée permet une amplification clonale (OneTouch2) suivie d'un enrichissement en « Ion Sphere Particles » (ISPs) à la surface desquelles un fragment de librairie est amplifié. L'amplification clonale est réalisée au cours d'une PCR en émulsion et contribuera à atteindre un seuil de détection du signal nécessaire et suffisant au moment du séquençage. Malgré une optimisation du ratio 1/1 (ISP / Fragment ADN), plusieurs configurations de microréacteurs sont envisageables. Seule la configuration de monoclonalité est souhaitée car elle seule, est source de données de séquençage. Les autres configurations généreront des données qui sont filtrées lors de la primo-analyse. L'amorce ePCR-A couplée à la biotine permettra l'enrichissement ultérieur par un système de capture sur billes liées à la streptavidine.

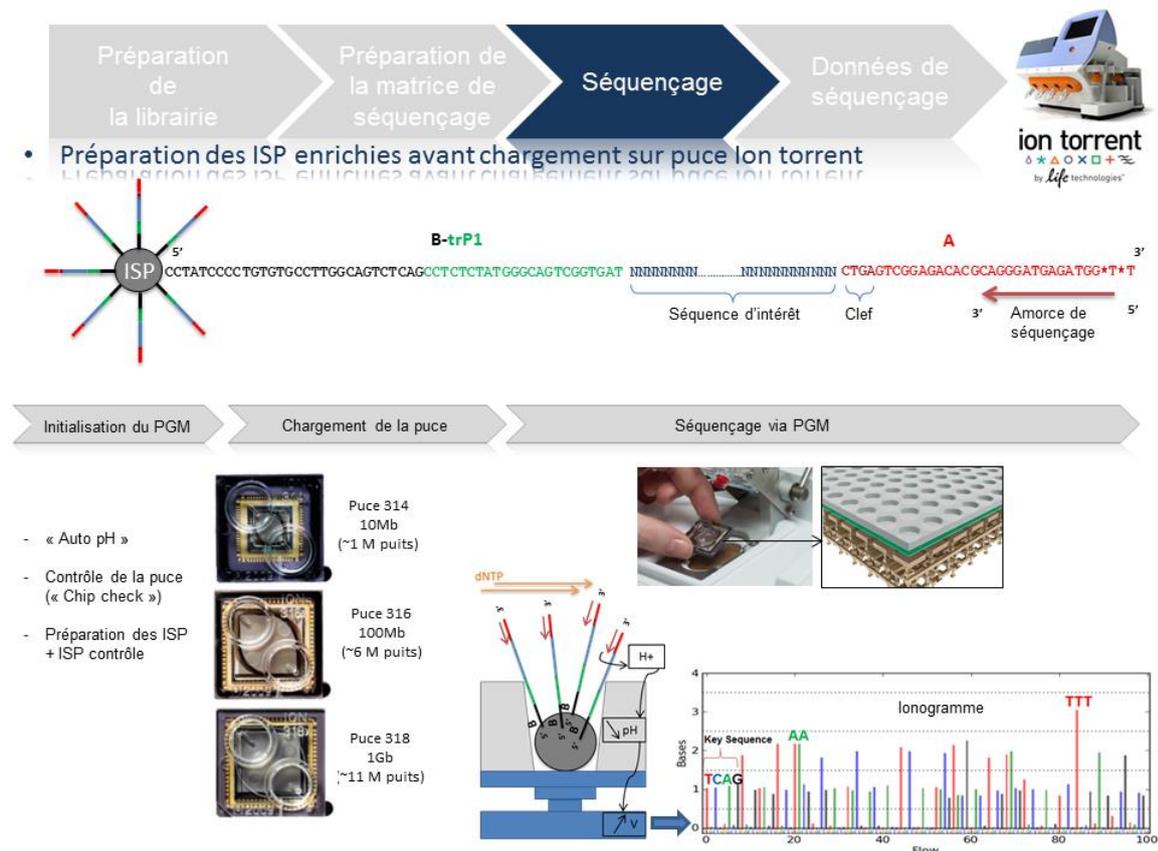
Figure 13. Préparation de la matrice séquençage sur le plateforme Ion Torrent. D'après <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/brands/ion-torrent.html>.



3) Séquençage

La matrice de séquençage couplée aux amorces de séquençage et à la polymérase est chargée sur la puce Ion Torrent selon un protocole bien spécifique. Les puces se déclinent selon plusieurs capacités de séquençage (Chip 314 >10Mb, Chip 316 >100Mb, Chip 318 >1Gb). Le séquençage en parallèle revient donc au décryptage simultané des fragments d'ADN couplés aux ISP. A chaque polymérisation de nucléotides non modifiés, la libération d'ions H⁺ entraîne une variation de pH, elle-même détectée au niveau de la couche mince (technologie des semi-conducteurs) située au fond de chaque puits. L'ensemble des données brutes générées est transcrits sous forme de ionogrammes.

Figure 14. Principe du séquençage sur le plateforme Ion Torrent. D'après <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/brands/ion-torrent.html>.



4) Données de séquençage

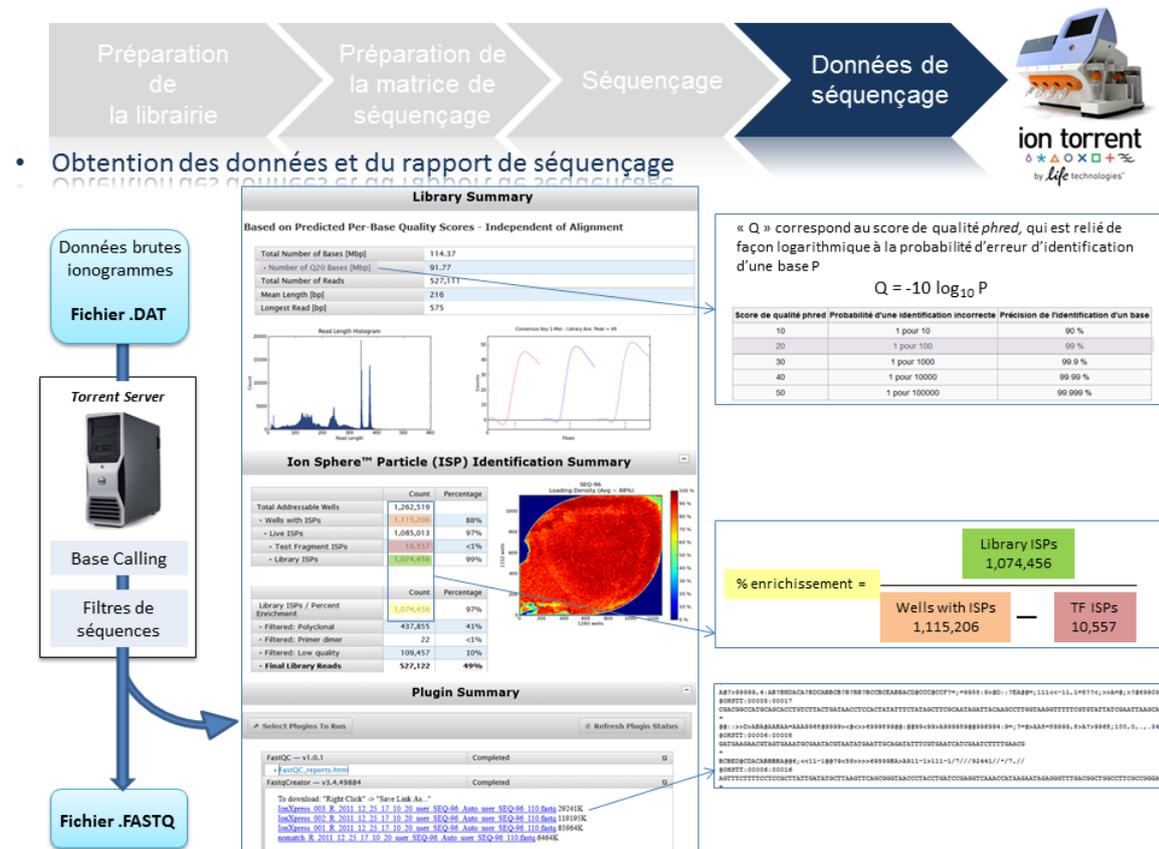
A l'issue du « run » de séquençage, le fichier .DAT regroupe l'ensemble des données brutes (ionogrammes). Ces fichiers sont transférés du PGM vers le Torrent Server. L'algorithme de « base calling » permet la conversion des données sous forme de lettres en séquences (A,T,C,G) formant le « read » (séquence au format fasta) associé à un score de qualité (Phred Score codé en ASCII), les deux types de données étant associés dans un fichier .FASTQ.

Un prétraitement est également appliqué sur la base des « reads » générés et qui équivaut au nombre d'ISPs vivantes ou « Live ISPs » (On parle d'ISPs vivantes pour les ISPs associées à la clef):

- « trimming » : élimination des adaptateurs et/ou portions de reads de mauvaise qualité
- filtres : élimination des « reads » de petites tailles, de mauvaise qualité, ou polyclonaux.

L'ensemble de ces informations est repris au travers du « report » généré à l'issue du séquençage et du prétraitement. Y sont également renseignés, le nombre de reads générés ainsi que leur taille moyenne.

Figure 15. Interprétation des données de séquençage Ion Torrent. D'après <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/brands/ion-torrent.html>.



3.2. Mise au point.

Plusieurs étapes de mise au point ont été réalisées pour permettre de séquencer des fragments d'ADNc, le panel initial étant adapté pour de l'ADN génomique ou tumoral fixée en paraffine, tout en diminuant la quantité d'ADN minimale requise (initialement 10ng), et ce malgré la fragmentation de l'ADNc.

Des expérimentations avec des quantités décroissantes d'ADNc et une augmentation du nombre de cycles de PCR lors de l'étape d'amplification des cibles ont permis de générer des bibliothèques en utilisant au minimum 3 nano grammes d'ADN tumoral ou circulant. Un maximum de 2 bibliothèques était regroupé sur une puce 318v2 pour atteindre une couverture minimale de 500X.

4. Interprétations des données

Nous avons travaillé sur les données préfiltrées par le serveur Ion torrent. Pour chaque échantillon, les données disponibles étaient la position du variant, sa fréquence, son type (insertion, délétion, variant nucléotidique), le nucléotide de référence et le variant associé ainsi que la couverture de lecture de chaque amplicon. Ces données ont été annotées manuellement avec la base de données IGV2.3 (Integrative Genomics Viewer) pour nommer la mutation identifiée. Une analyse des mutations identifiées a été réalisée dans un second temps avec la base de données COSMIC (Catalog of somatic mutation in cancer) afin d'éliminer les polymorphismes nucléotidiques connus.

Un seuil de fréquence allélique de 5% avec une couverture minimale de 500X était requis pour retenir une mutation. Pour des mutations initialement identifiées et suivies au cours du temps, un seuil minimal de 1% était retenu.

5. Concordance des mutations identifiées dans l'ADNct et le tissu tumoral correspondant.

5.1. Détails des mutations identifiées dans l'ADNct.

Au total, 159 échantillons d'ADN circulant ont pu être séquencés. La couverture moyenne était de 1685X.

A l'initiation du traitement, 44 mutations différentes chez 23 patients ont été mises en évidence dans l'ADNct sur les 39 patients testés.

Parmi les mutations identifiées, les gènes *TP53*, *PIK3CA* et *KRAS* étaient les plus fréquemment mutés avec respectivement 18 (41%), 9 (20%), 8 (18%) mutations retrouvées. Le nombre médian de mutation par échantillon était de 2 (1-5) et la fréquence allélique de 15% en moyenne (1-60%). Les patients avec une mutation détectée dans l'ADNc à l'initiation du traitement avaient une concentration d'ADNc statistiquement plus élevée que les patients négatifs 26,4 ng/mL vs. 9 ng/mL de plasma ($p < 0.05$). Néanmoins, des mutations ont pu être identifiées pour 4 patients dont les concentration d'ADNc étaient de l'ordre de 5ng/ml de plasma.

Le séquençage d'échantillons ultérieurs d'ADNct, alors que le traitement avait été initié a identifié des mutations dans l'ADNct chez 4 patients supplémentaires : une mutation *PIK3CA* E545K (fréquence allélique, 5%), une mutation de *PTEN*, L70fs*4 (fréquence allélique 10,6%), une mutation *TP53* P190L (fréquence allélique, 7%) et une mutation de *BRAF* V600 (fréquence allélique, 5%).

Au total, 27/39 (69%) avaient au moins une mutation identifiée dans l'ADNct. Le détail des mutations dans l'ADNct est reporté table 6 et 7.

Tableau 6. Concordance des mutations détectées dans l'ADNct et la tumeur.

	Patient N°	TUMOR																																												
		1	5	7	15	16	23	25	26	27	31	34	36	3	4	8	9	10	11	19	22	39	2	6	12	13	17	28	29	14	33	38	24	32	20	35	21	37	30	18						
TUMOR	Mutated Gene	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon	Ovary	Ovary	Ovary	Ovary	Ovary	Ovary	Ovary	Ovary	Ovary	Breast	Breast	Breast	Breast	Breast	Breast	Bladder	Bladder	Bladder	Glioblastoma	Glioblastoma	Lung	Lung	Endometrium	Kidney	Melanoma	Penile							
	TP53	*																																												
	PIK3CA																																													
	KRAS																																													
	APC							*																																						
	PTEN																																													
	FBXW7																																													
	SMAD4																																													
	NRAS																																													
	CTTNB1																																													
	CDKN2A																																													
	BRAF																																													
	ATM																																													
	PLASMA	Mutated Gene																																												
TP53		*																																												
PIK3CA																																														
KRAS																																														
APC																																														
PTEN																																														
FBXW7																																														
SMAD4																																														
NRAS																																														
CTTNB1																																														
CDKN2A																																														
BRAF																																														
ATM																																														
Concentration of cfDNA (ng/ml of plasma)		12,3 ng/ml	62 ng/ml	88 ng/ml	56,2 ng/ml	12,5 ng/ml	3,7 ng/ml	2,7 ng/ml	48,9 ng/ml	13,4 ng/ml	5,8 ng/ml	4,6 ng/ml	105 ng/ml	6,3 ng/ml	5 ng/ml	13,8 ng/ml	6,7 ng/ml	4,9 ng/ml	2,9 ng/ml	5,6 ng/ml	4,7 ng/ml	109 ng/ml	5,9 ng/ml	2,8 ng/ml	10 ng/ml	23,1 ng/ml	13,4 ng/ml	23 ng/ml	5,4 ng/ml	6,1 ng/ml	6,9 ng/ml	4,9 ng/ml	4,2 ng/ml	5 ng/ml	5,7 ng/ml	6,4 ng/ml	31 ng/ml	10 ng/ml	10,6 ng/ml	4,2 ng/ml						
Time between Tumor FFPE and plasma (days)	1032	0	1118	9	1573	806	1630	269	503	988	154	0	1136	90	31	12	374	420	598	60	383	1630	795	35	0	7	317	162	321	309	250	622	479	30	878	1627	761	201	316							
Concordance Tumor/plasma	100%	100%	100%	100%	100%	50%	0%	100%	0%	50%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	50%	0%	100%	100%	100%	100%	25%	100%	100%	100%	66%	0%	0%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%						

■ Mutation identifiée dans la tumeur
■ Mutation identifiée dans le plasma
■ Mutation identifiée uniquement dans le plasma et non retrouvée dans la tumeur
■ Mutation identifiée dans le plasma au cours du temps mais non présente au début du traitement
■ * Ce sigle indique que 2 mutation différentes sur le même gène sont indentifiées

Tableau 7. Détails des mutations identifiées dans l'ADNct et le tissu tumoral.

ND : non détecté

% : représente la fréquence allélique.

		TUMEUR				PLASMA			
		PGM				PGM			
N°	Type tumoral	Gene	Mutation	%	Couverture	Gene	Mutation	%	Couverture
#1	Colo-rectal	KRAS	G12V	46	820	KRAS	G12V	19	630
		TP53	R248Q	31	991	TP53	R248Q	9	1997
		TP53	R158fs*11	50	825	TP53	R158fs*11	16	1008
#2	Sein	APC	A1492fs*15	44	989	APC	A1492fs*15	15	746
		TP53	H193Y	37	1008	TP53	H193Y	ND	3187
		TP53	S96fs*53	87	368	TP53	S96fs*53	ND	879
#3	Ovaire	KRAS	G12D	20	1555	KRAS	G12D	ND	473
		PIK3CA	E545K	23	1717	PIK3CA	E545K	ND	678
		TP53	R282W	31	1447	TP53	R282W	43	904
#4	Colo-rectal	KRAS	G12S	43	533	KRAS	G12S	ND	473
		PIK3CA	N1044S	39	516	PIK3CA	N1044S	9,1	986
		PIK3CA	Q546K	26	754	PIK3CA	Q546K	31	802
#5	Colo-rectal	TP53	Y234*	28	640	TP53	Y234*	57	1070
		KRAS	G12C	19	772	KRAS	G12C	36	484
		APC	E1374*	30	712	APC	E1374*	33	483
#6	Ovaire	PIK3CA	E545K	16	6676	PIK3CA	E545K	ND	2333
		KRAS	G12D	29	6801	KRAS	G12D	ND	522
		TP53	Y220C	ND	700	TP53	Y220C	5,4	1162
#7	Ovaire	PIK3CA	E542K	40	7169	PIK3CA	E542K	ND	3895
		TP53	R175H	67	255	TP53	R175H	ND	858
		TP53	H179R	90	353	TP53	H179R	13,6	655
#8	Ovaire	TP53	R175H	23	175	TP53	R175H	7,6	1799
		TP53	D281H	17	281	TP53	D281H	2	1756
		CDKN2A	H83Y	76	212	CDKN2A	H83Y	4	1626
#9	Vessie	KRAS	G12S	37	2662	NRAS	G12S	51	1088
		KRAS	G12D	25	907	KRAS	G12D	7,9	665
		PIK3CA	Q546R	24	1130	PIK3CA	Q546R	13	1785
#10	Colo-rectal	TP53	G244D	33	930	TP53	G244D	6,7	2100
		TP53	R342fs*2	30	238	TP53	R342fs*2	23	1214
		PIK3CA	E545K	9,1	1483	PIK3CA	E545K	4,9	1763
#11	Pénis	TP53	A138P	64	446	TP53	A138P	ND	2413
		PTEN	EXON3-4S	26	899	PTEN	EXON3-4S	ND	1237
		KRAS	G12C	57	2084	KRAS	G12C	ND	849
#12	Endomètre	TP53	P190L	89	1213	TP53	P190L	ND	550
		PTEN	L70fs*4	11,5	1795	PTEN	L70fs*4	ND	546
		KRAS	G12V	40	1705	KRAS	G12V	4,4	1365
#13	Ovaire	TP53	R175H	58	151	TP53	R175H	ND	686
		TP53	K132N	65	689	TP53	K132N	ND	1235
		PIK3CA	R115L	31	936	PIK3CA	R115L	ND	420
#14	Colo-rectal	PIK3CA	E542K	33	954	PIK3CA	E542K	ND	116
		KRAS	G12V	43	2380	KRAS	G12V	ND	1119
		PTEN	V317fs*	28	1938	PTEN	V317fs*	ND	1300
#15	Colo-rectal	TP53	R273C	65	2231	TP53	R273C	ND	373
		KRAS	Q61H	75	5376	KRAS	Q61H	51	2960
		APC	S1501A	57	937	APC	S1501A	28	1915
#16	Colo-rectal	APC	S1495fs*14	41	2213	APC	S1495fs*14	26	1790
		SMAD4	G386R	49	1171	SMAD4	G386R	26	280
		ATM	R337C	42	1179	ATM	R337C	18	781
#17	Colo-rectal	KRAS	G12V	40	1897	KRAS	G12V	ND	3627
		TP53	P151S	45	247	TP53	P151S	ND	2776
		PIK3CA	E545K	16	1183	PIK3CA	E545K	ND	2327
#18	Sein	PTEN	L325R	22	851	PTEN	L325R	ND	1661
		PTEN	E235fs*2	11	922	PTEN	E235fs*2	ND	1495
		TP53	N210fs*54	39	524	TP53	N210fs*54	ND	3450
#19	Sein	TP53	E171*	70	240	TP53	E171*	6,5	740
		BRAF	V600E	58	1395	BRAF	V600E	ND	2238
		KRAS	G12D	8	1845	KRAS	G12D	3,4	567
#20	Colo-rectal	APC	R1114*	9	3491	APC	R1114*	ND	685
		FBXW7	R484K	6	439	FBXW7	R484K	ND	5600
		PIK3CA	E545K	28	3253	PIK3CA	E545K	8,5	778
#21	Vessie	TP53	E180K	12	899	TP53	E180K	6,1	836
		TP53	R175H	19	899	TP53	R175H	8	840
		KRAS	G12D	33	769	KRAS	G12D	4,5	866
#22	Colo-rectal	TP53	R175H	29	879	TP53	R175H	16	1119

		TUMEUR				PLASMA			
#35	Poumon	TP53	G154V	16	386	TP53	G154V	4,6	1080
#36	Colo-rectal	PIK3CA	H1074R	56	819	PIK3CA	H1074R	40	1503
		TP53	R175H	57	205	TP53	R175H	60	1287
#37	Rein	TP53	E285K	51	226	TP53	E285K	16,3	632
#38	Vessie	PIK3CA	E545K	56	2266	PIK3CA	E545K	9,4	1024
		TP53	D281N	44	950	TP53	D281N	3,2	724
#39	Ovaire	TP53	P278L	44	951	TP53	P278L	ND	732
		CTNNB1	S33C	24	678	CTNNB1	S33C	ND	1425
		PIK3CA	N345K	41	946	PIK3CA	N345K	7,8	4139

5.2. Validation des mutations par PCR digitale.

Les mutations identifiées dans l'ADNct ont été validées par PCR digitale en gouttelette (BioRad) sur 19 échantillons pris au hasard et pour lesquels une mutation de *PIK3CA*, *TP53* ou *KRAS* était connue sur dans la tumeur analysée.

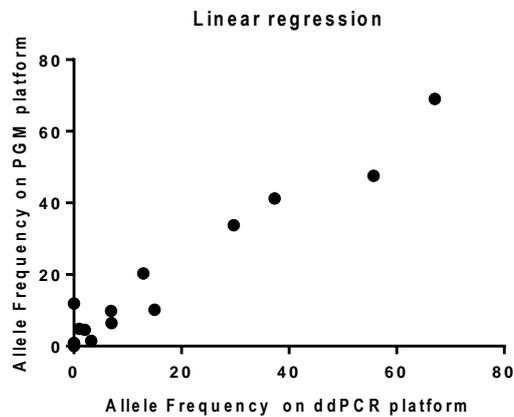
Toutes les mutations identifiées dans l'ADNct ont été identifiées sur les 2 plateformes avec des fréquences alléliques variant de 1 à 67%.

Parmi les 8 échantillons d'ADNct testés en séquençage et sans mutation identifiée, 5 étaient négatif en ddPCR et 3 ont eu une mutation de *PIK3CA* identifiée avec une fréquence allélique inférieure à 1% (Tableau 8). Le coefficient de concordance entre les 2 plateformes était excellent [0.98; IC 95%, 0.94–0.99; $P < 0.0001$] (Figure 16).

Tableau 8. Validation des mutations et des fréquences alléliques sur la plateforme droplet digital PCR (Biorad) sur 19 échantillons pris au hasard. ND : non détectée.

Echantillons	Gene	Mutation	Fréquence allélique (ddpcr)	Fréquence allélique (PGM)
#a	T53	R248Q	33,8%	29,7%
#b	KRAS	G12V	47,6%	55,7%
#c	KRAS	G12C	41,2%	37,3%
#d	KRAS	G12D	10,2%	15,0%
#e	PIK3CA	E545K	6,4%	7,0%
#f	PIK3CA	E545K	11,9%	ND
#g	PIK3CA	E545K	4,8%	1%
#h	PIK3CA	E545K	9,8%	6,9%
#i	PIK3CA	E545K	20,3%	12,9%
#j	PIK3CA	E545K	4,6%	2%
#k	PIK3CA	E545K	1,5%	3,2%
#l	PIK3CA	E542K	0,7%	ND
#m	PIK3CA	E542K	0,9%	ND
#n	PIK3CA	E545K	ND	ND
#o	PIK3CA	E545K	ND	ND
#p	PIK3CA	E545K	ND	ND
#q	PIK3CA	E545K	ND	ND
#r	PIK3CA	E545K	ND	ND
#s	PIK3CA	E542K	69	67,1

Figure 16. Corrélation des fréquences alléliques pour un même échantillon en séquençage sur la plateforme PGM et en PCR digitale sur la plateforme Biorad.



Coefficient de corrélation: 0,98; IC 95% [0,94-0,99], $p < 0.0001$

5.3. Concordance des mutations identifiées dans la tumeur et l'ADNct.

Toutes les mutations identifiées dans l'ADNct avaient été identifiées dans les échantillons correspondants de tissu tumoral à l'exception d'une mutation *de novo* du gène *TP53* Y220C (fréquence allélique 5%) retrouvée chez une patiente avec un cancer de l'ovaire. Les données de séquençage de cette tumeur sur la plateforme Miseq d'illumina et de l'ADN germinale ont confirmé l'absence de cette mutation sur le tissu tumoral ou en constitutionnel. Le détail des mutations identifiées dans le tissu tumoral et la concordance avec le plasma sont détaillées dans les tableaux 6 et 7.

6. Dynamique des mutations identifiées dans l'ADNct ou cours du traitement.

Le séquençage de l'ADNct a été réalisé de façon longitudinale pour tous les patients traités. Au total, 159 échantillons d'ADNct représentant des temps différents du traitement ont été séquencés chez les 39 patients.

Le type de mutations identifiées, leur fréquence allélique ont été corrélés avec l'évolution clinique et l'efficacité de la thérapie évaluée de manière conventionnelle par scanner selon les critères RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors).

Pour les 23 patients présentant une mutation identifiée dans l'ADNct à l'initiation du traitement (J0), des variations de fréquence allélique ont été observée au cours du traitement. Différents scénarios sont décrits ci-dessous.

Les données concernant l'ensemble des patients sont présentées en annexe 4.

6.1. Patients présentant une diminution de la fréquence allélique des mutations dans l'ADNct en cours de traitement.

Patient #1.

Il s'agit d'une femme de 76 ans traitée pour un cancer colorectal métastatique présentant dans l'ADNct des mutations de *KRAS* (G12V), *TP53* (R248Q and R158fs*), *APC* (A1492fs15) à des fréquences alléliques respectives de 19,9%, 9%, 16%, 15,5%.

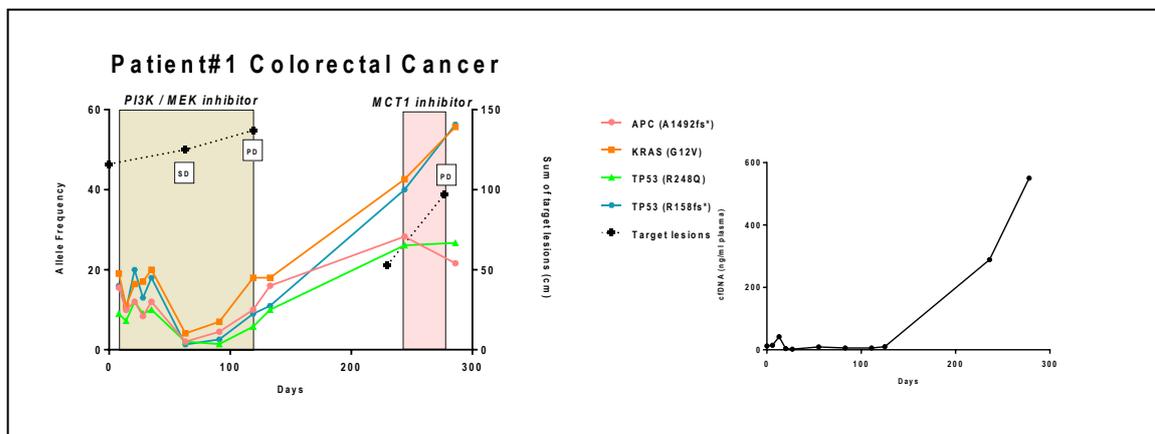
Cette patiente a reçu l'association d'un inhibiteur de PI3KCA et de MEK. Après 63 jours de traitement, les fréquences alléliques des mutations dans l'ADNct ont diminué jusqu'à de très faibles niveaux 4,1%, 2%, 1,3%, 2% respectivement, suggérant une réponse clonale. L'évaluation scannographique a montré une stabilité des lésions tumorales maintenue pendant 119 jours. A la progression sous traitement, les fréquences alléliques des mutations plasmatiques ont augmenté à 18%, 5,8%, 9%, et 10%, respectivement. A l'arrêt du traitement, on a pu constater une évolution très rapide des fréquences alléliques des mutations à 21,6%, 55,7%, 26,7%, et 56,3% respectivement.

Figure 17. Patiente #1. Variations de la fréquence allélique au cours du traitement des mutations identifiées dans l'ADNct et évolution de la concentration totale de l'ADNct au cours du traitement pour la patiente.

Les fréquences alléliques de chacune des mutations dans l'ADNct sont représentées sur l'axe gauche en ordonnée. La somme des lésions cibles sur le scanner est représentée sur l'axe droit des ordonnées.

SD : Stable Disease ou maladie stable. PD : Progressive disease ou progression tumorale.

Le carré coloré représente la période pendant laquelle le patient reçoit le traitement ciblé. Le second graphe décrit l'évolution des concentrations d'ADNct au cours du traitement.



Patient #18.

Il s'agit d'un patient de 53 présentant un cancer de la verge métastatique avec une mutation tumorale de *PIK3CA* E545K (9,1% dans la tumeur) identifiée dans l'ADNct avec une fréquence allélique de 4,9%.

Ce patient a reçu un inhibiteur de PI3KCA et après 40 jours de traitement, la fréquence allélique de la mutation *PIK3CA* E545K dans l'ADNct a successivement diminué de 4,9% puis 1%. L'évaluation scannographique a montré une stabilité tumorale en critère RECIST mais avec une cavitation des lésions pulmonaires suggérant une réponse tumorale. Après 68 jours de traitement, la fréquence allélique de la mutation a augmenté à nouveau à 8,7% et le patient a progressé radiologiquement au jour 131 de traitement.

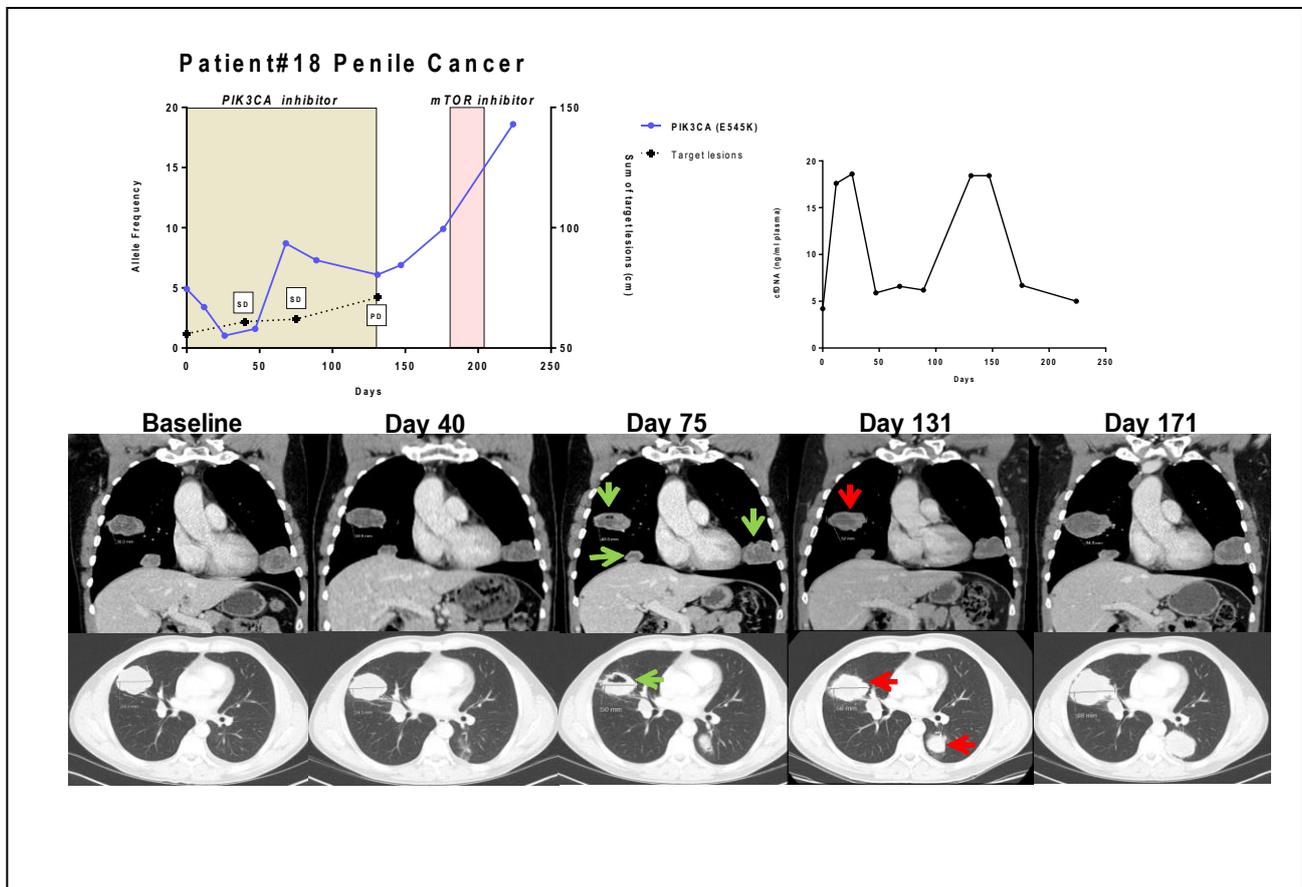
A l'arrêt du traitement, la fréquence allélique de la mutation *PIK3CA* E545K a rapidement augmenté jusqu'à 18,6% malgré l'administration d'une seconde thérapie ciblée, ciblant mTOR.

Figure 18. Patient #18. Variations de la fréquence allélique au cours du traitement des mutations identifiées dans l'ADNct et évolutions de la concentration de l'ADNct au cours du traitement pour la patiente. Evolution des images scannographiques au cours de temps.

Les fréquences alléliques de chacune des mutations dans l'ADNct sont représentées sur l'axe gauche en ordonnée. La somme des lésions cibles sur le scanner est représentée sur l'axe droit des ordonnées.

SD : Stable Disease ou maladie stable. PD : Progressive disease ou progression tumorale.

Le carré coloré représente la période pendant laquelle le patient reçoit le traitement ciblé. Le second graphe décrit l'évolution des concentrations d'ADNct au cours du traitement.



Patient #23

Il s'agit d'une femme de 40 ans traitée pour un cancer colorectal *KRAS* muté (G12V) traitée par une combinaison d'un inhibiteur de MEK et de IGF1R. Cette mutation était détectée dans le plasma à 4.4% et est devenue indétectable après 28 jours de traitement. D'un point de vue RECIST, la maladie était considérée comme stable. Elle est sortie de l'essai au terme de 139 jours de traitement pour toxicité sans que la mutation *KRAS* soit redevenue détectable dans l'ADNct.

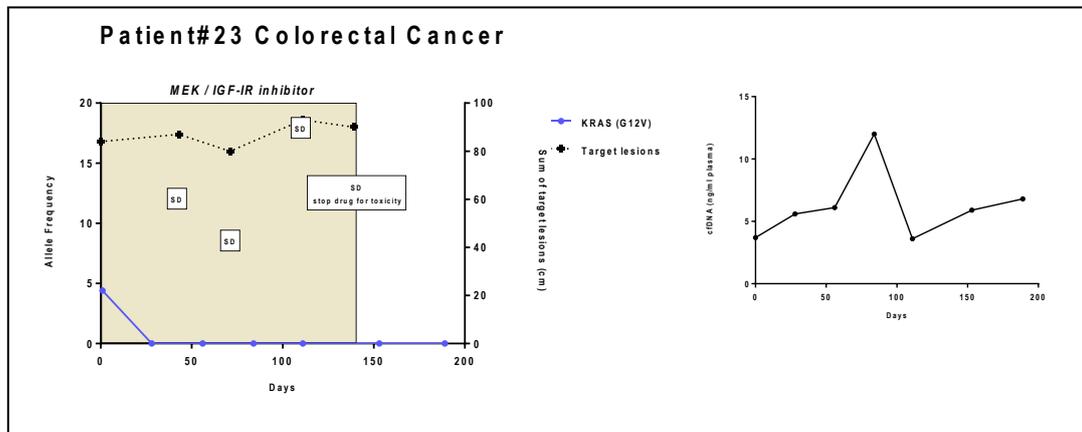
Figure 19. Patiente #23. Variations de la fréquence allélique au cours du traitement des mutations identifiées dans l'ADNct et évolution de la concentration de l'ADNct au cours du traitement pour la patiente.

Les fréquences alléliques de chacune des mutations dans l'ADNct sont représentées sur l'axe gauche en ordonnée.

La somme des lésions cibles sur le scanner est représentée sur l'axe droit des ordonnées.

SD : Stable Disease ou maladie stable. PD : Progressive disease ou progression tumorale.

Le carré coloré représente la période pendant laquelle le patient reçoit le traitement ciblé. Le second graphe décrit l'évolution des concentrations d'ADNct au cours du traitement.



Patient #39

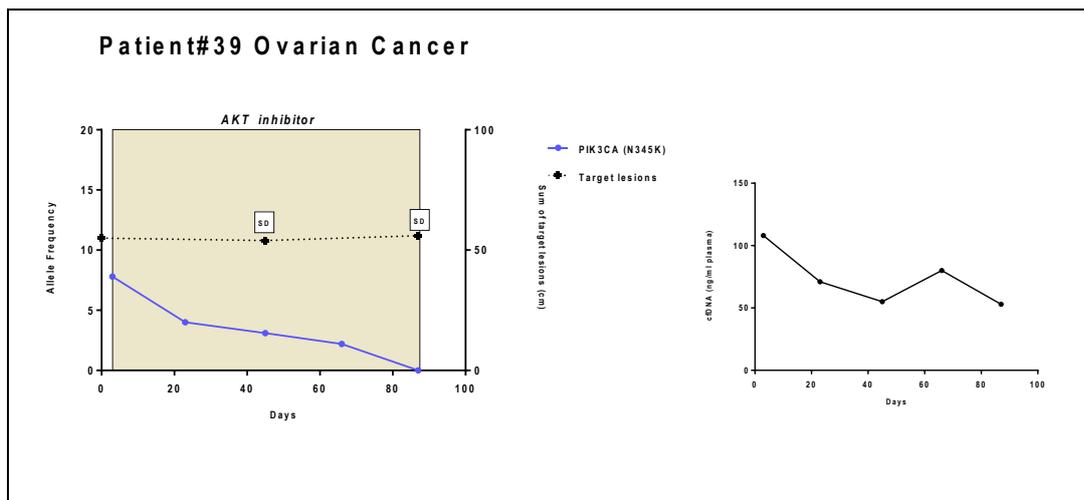
Il s'agit d'une patiente de 38 ans traitée pour un cancer de l'ovaire à cellules claires muté *PIK3CA* (N345K) et *CTNNB1* (S33C). Cette patiente a été traitée avec un inhibiteur d'AKT avec une diminution progressive de la mutation *PIK3CA* dans l'ADNct de 7,8% à 3,1% après 45 jours de traitement avec une stabilité tumorale sur le scanner.

Figure 20. Patiente #39. Variations de la fréquence allélique au cours du traitement des mutations identifiées dans l'ADNct et évolution de la concentration de l'ADNct au cours du traitement pour la patiente.

Les fréquences alléliques de chacune des mutations dans l'ADNct sont représentées sur l'axe gauche en ordonnée. La somme des lésions cibles sur le scanner est représentée sur l'axe droit des ordonnées.

SD : Stable Disease ou maladie stable. PD : Progressive disease ou progression tumorale.

Le carré coloré représente la période pendant laquelle le patient reçoit le traitement ciblé. Le second graphe décrit l'évolution des concentrations d'ADNct au cours du traitement.



En conclusion, pour ces 4 patients, une diminution de la fréquence allélique des mutations identifiées dans l'ADNct a été observée au cours du temps. Cette diminution était associée à une réponse tumorale ou à une maladie considérée comme stable et donc à une efficacité de la thérapie à l'étude. La dynamique de l'ADNct semble suggérer une réponse moléculaire.

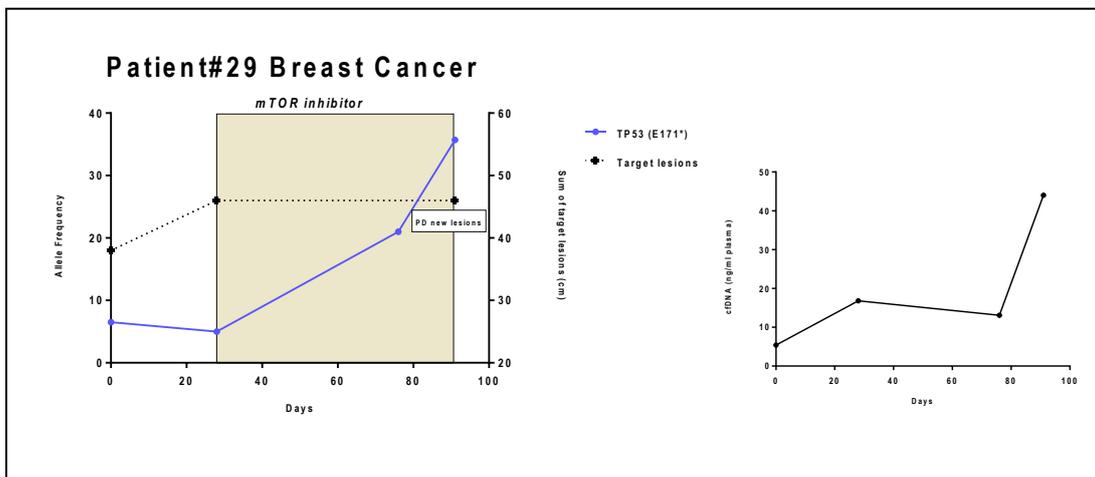
6.2. Patients présentant une augmentation de la fréquence allélique des mutations dans l'ADNct en cours de traitement.

Patient#29

Cette patiente de 58 ans présentant un cancer du sein muté *TP53* a reçu un inhibiteur de mTORC1/2. La mutation *TP53* dans l'ADNct a rapidement augmenté de 6,5% à 37% lors de la progression tumorale. Le traitement a été stoppé rapidement.

Figure 21. Patiente #29. Variations de la fréquence allélique au cours du traitement des mutations identifiées dans l'ADNct et évolution de la concentration de l'ADNct au cours du traitement pour la patiente.

Les fréquences alléliques de chacune des mutations dans l'ADNct sont représentées sur l'axe gauche en ordonnée. La somme des lésions cibles sur le scanner est représentée sur l'axe droit des ordonnées. SD : Stable Disease ou maladie stable. PD : Progressive disease ou progression tumorale. Le carré coloré représente la période pendant laquelle le patient reçoit le traitement ciblé. Le second graphe décrit l'évolution des concentrations d'ADNct au cours du traitement.



Patient #5

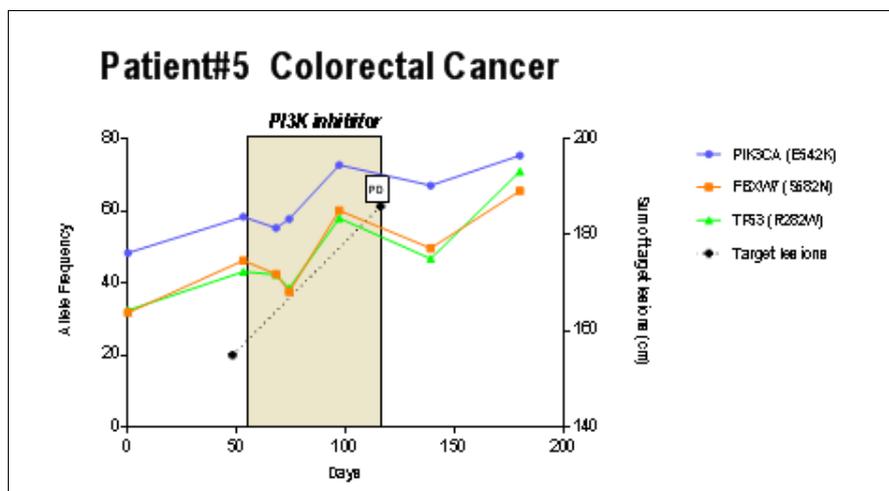
Ce patient de 65 ans traité pour un cancer colorectal muté *PIK3CA*, *FBXW7* et *TP53* a reçu un inhibiteur de PIK3CA. Les 3 mutations ont été identifiées dans l'ADNct et ont montré le même profil évolutif sous traitement avec une augmentation des fréquences alléliques de 58 à 72%, de 46 à 60%, de 43 à 58% pour *PIK3CA*, *FBXW7* et *TP53* respectivement après 42 jours de traitement. Le patient est rapidement sorti d'étude pour progression tumorale.

Figure 22. Patiente #5. Variations de la fréquence allélique au cours du traitement des mutations identifiées dans l'ADNct et évolution de la concentration de l'ADNct au cours du traitement pour la patiente.

Les fréquences alléliques de chacune des mutations dans l'ADNct sont représentées sur l'axe gauche en ordonnée. La somme des lésions cibles sur le scanner est représentée sur l'axe droit des ordonnées.

SD : Stable Disease ou maladie stable. PD : Progressive disease ou progression tumorale.

Le carré coloré représente la période pendant laquelle le patient reçoit le traitement ciblé. Le second graphe décrit l'évolution des concentrations d'ADNct au cours du traitement.



En conclusion, pour ces 2 patients, une augmentation de la fréquence allélique des mutations identifiées dans l'ADNct a été observée au cours du temps. Cette augmentation était associée à une progression tumorale et à un arrêt rapide du traitement à l'étude.

6.3. Patient présentant une évolution discordante entre la variation de la fréquence allélique des mutations de l'ADNct et la réponse au traitement.

Deux patients ont présenté une « réponse moléculaire » et scannographique discordantes.

La patiente #6 présentait un cancer du sein métastatique osseux, pleural, péricardique et péritonéal. La tumeur présentait une mutation *PIK3CA* (N1044S) et *KRAS* (G12S). Ces deux mutations ont été identifiées dans l'ADNct.

Elle a reçu un inhibiteur de *PIK3CA* qui a permis de faire disparaître la mutation *PIK3CA* de 9,1% à l'initiation du traitement jusqu'à un niveau indétectable. De manière concomitante, le scanner a montré une aggravation de l'épanchement pleural, péricardique et de l'ascite. La patiente est sortie rapidement de l'étude pour progression et est décédée rapidement.

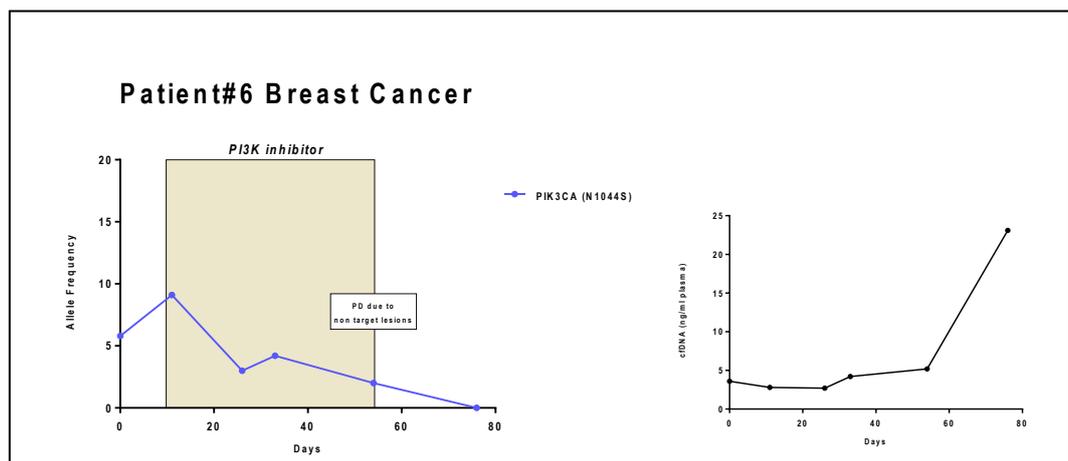
Figure 23. Patiente #6. Variations de la fréquence allélique au cours du traitement des mutations identifiées dans l'ADNct et évolution de la concentration de l'ADNct au cours du traitement pour la patiente.

Les fréquences alléliques de chacune des mutations dans l'ADNct sont représentées sur l'axe gauche en ordonnée.

La somme des lésions cibles sur le scanner est représentée sur l'axe droit des ordonnées.

SD : Stable Disease ou maladie stable. PD : Progressive disease ou progression tumorale.

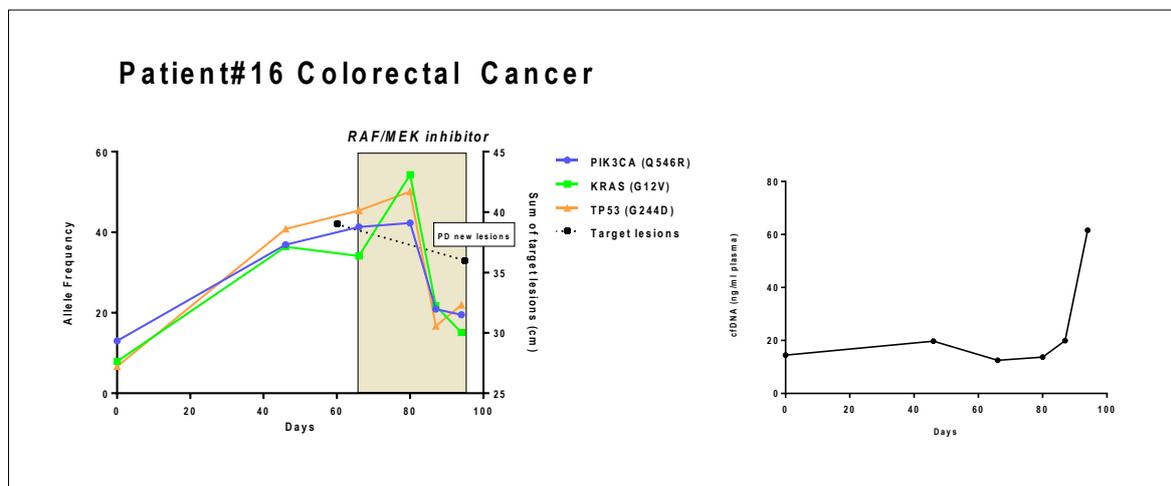
Le carré coloré représente la période pendant laquelle le patient reçoit le traitement ciblé. Le second graphe décrit l'évolution des concentrations d'ADNct au cours du traitement.



Le second patient (patient #16), présentait un cancer colorectal métastatique osseux muté *KRAS* (G12D), *PIK3CA* (Q546R) et *TP53* (G244D) traité par un inhibiteur de *RAF/MEK*.

Après 29 jours de traitement, une IRM précoce réalisée en raison d'une aggravation de douleurs dorsales a montré la majoration d'une épидурite en regard de la vertèbre T11. Le patient est sorti d'étude pour progression tumorale. Néanmoins, le suivi des mutations dans l'ADNct a montré une diminution successive de l'ensemble des fréquences alléliques des mutations identifiées : *KRAS* de 34,1% à 21,7%, *PIK3CA* de 41,3% à 19,5%, *TP53* de 45,4 à 16,7%. Le marqueur tumoral ACE était lui aussi en diminution passant de 124 U/l à 82 U/l malgré cette progression clinique.

Figure 24. Patiente #16. Variations de la fréquence allélique au cours du traitement des mutations identifiées dans l'ADNct et évolution de la concentration de l'ADNct au cours du traitement pour la patiente.



6.4. Potentielle évolution clonale mise en évidence par le suivi de plusieurs mutations dans l'ADNct au sein d'un même échantillon.

La technologie de type séquençage permet de suivre en même temps la présence et la fréquence allélique de plusieurs mutations présentes au sein d'un même échantillon. Ainsi, la coexistence de plusieurs mutations dans l'ADNct a été mise en évidence au sein d'un même échantillon chez 10 patients.

Deux scénarios évolutifs ont été mise en évidence.

Pour les patients #5 et #26 (Figure 21), la dynamique des fréquences alléliques semblait superposable pour les 3 mutations identifiées.

En revanche pour les patients, #1, #13 et #33, cette dynamique ne semblait pas superposable, suggérant une possible évolution clonale disparate sous traitement.

Figure 25. Suivi au cours du temps des fréquences alléliques d'échantillons d'ADNct avec plusieurs mutations différentes identifiées.

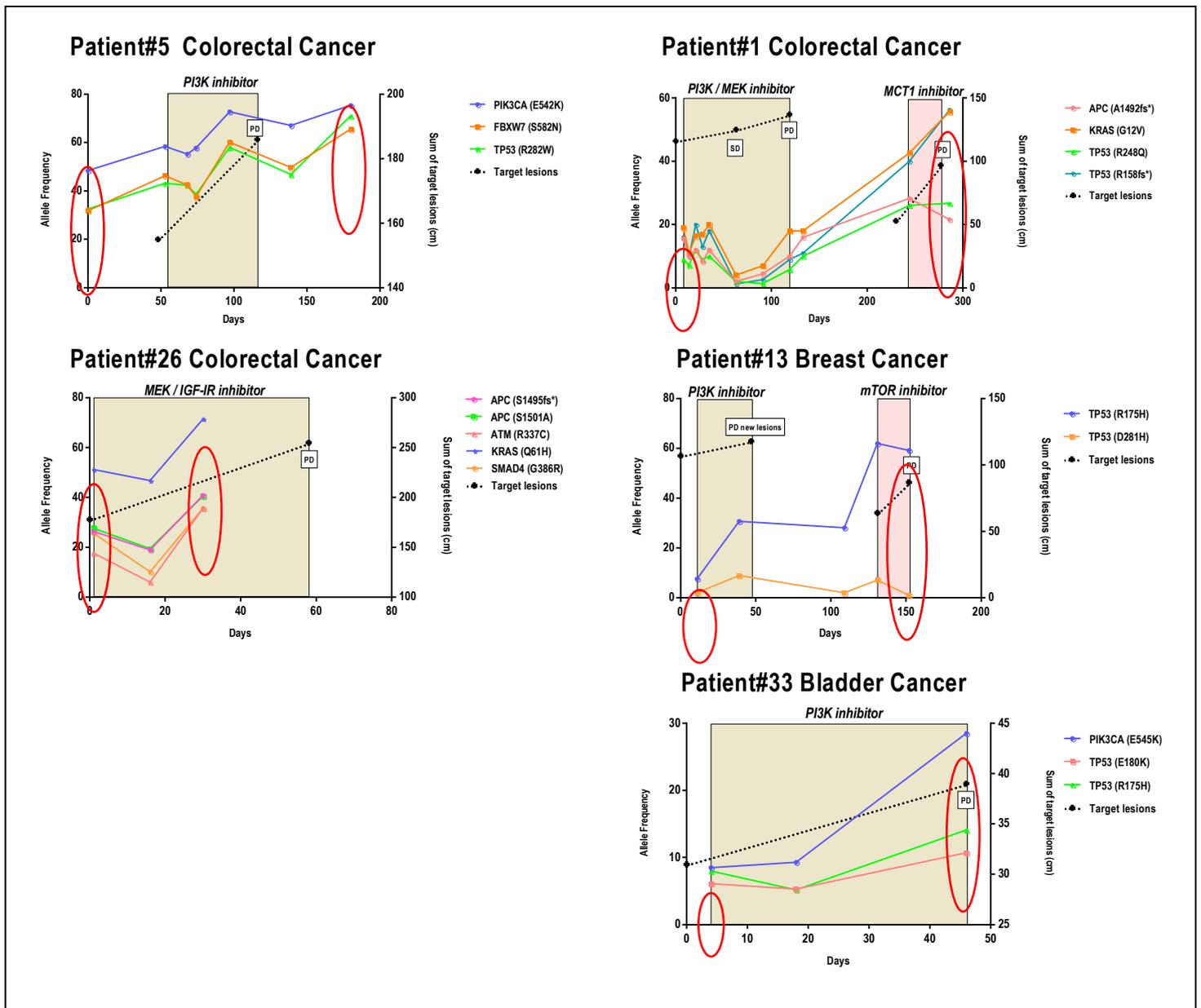
Les fréquences alléliques de chacune des mutations dans l'ADNct sont représentées sur l'axe gauche en ordonnée. La somme des lésions cibles sur le scanner est représentée sur l'axe droit des ordonnées.

SD : Stable Disease ou maladie stable. PD : Progressive disease ou progression tumorale.

Le carré coloré représente la période pendant laquelle le patient reçoit le traitement ciblé. Le second graphe décrit l'évolution des concentrations d'ADNct au cours du traitement.

Les patients #5 et # 26 montrent ont une évolution en parallèle des différentes mutations identifiées.

Les patients #1, #13, #33 ont une évolution différentielle des FA selon la mutation, suggérant la présence d'une réponse clonale.



6.5. Variations quantitative de la fréquence allélique des mutations dans l'ADNct et réponse au traitement.

Pour les 23 patients avec une mutation identifiée au début du traitement, nous avons corrélé la variation quantitative des fréquences alléliques avec l'évaluation RECIST.

Deux groupes ont été séparés : groupe A avec une diminution de plus de 30% de la fréquence allélique au cycle 2 par rapport au baseline (n=9) et groupe B (n=14) pour les patients restants. Ce delta de 30% a été choisi par analogie aux critères RECIST qui établissent qu'une diminution des lésions cibles de 30% en imagerie correspond à une réponse thérapeutique.

Le temps à progression des patients du groupe A était significativement différent : 111 jours contre 55 jours ($P=0.0165$). Parmi les 9 patients du groupe A, 7 patients avaient une maladie stable en critère RECIST, et 2 ont progressé. Parmi les patients du groupe B, 12 ont progressé tandis que 2 avaient une maladie stable.

Le temps médian à progression des patients ayant un déclin de fréquence allélique et les patients ayant une stabilité en critères RECIST étaient identiques (111 jours versus 111 jours, $p= 0.728$). Le temps jusqu'à progression des patients du groupe B était similaire à ceux des patients ayant une maladie progressive : 55 jours versus 42 jour, $p= 0.35$. (Tableau 9).

Tableau 9. Temps à progression selon le delta de fréquence allélique des mutations identifiées dans l'ADNct entre C2D1 et C1D1 (seuil de 30%) et corrélation avec l'évaluation selon les critères RECIST.

	Delta de fréquence allélique (C2D1 versus à C1D1)	
	$\Delta AF \geq -30\%$	$\Delta AF < -30\%$
n	9	14
Temps à progression (médiane)	111 jours	55 jours
	Evaluation RECIST après 2 cycles	
	Maladie Stable	Progression
n	7	12
Temps à progression (médiane)	111 jours	42 jours

Discussion générale.

Nous avons démontré la faisabilité de l'identification d'altérations moléculaires à partir de l'ADNct dans une série de patients adressés pour l'inclusion dans un essai thérapeutique de phase I et porteurs de divers types tumoraux. Notre approche était un séquençage ciblé, à partir de panel de gènes commerciaux et validés au préalable. La concordance des mutations dans l'ADNct et le tissu tumoral était variable et nous avons par ailleurs mis en évidence des variations dynamiques des mutations de l'ADNct au cours du traitement suggérant une réponse moléculaire. Ces observations font de l'ADNct un biomarqueur d'intérêt majeur.

1. Analyse des mutations dans l'ADNct : validité du statut de biomarqueur.

La qualification d'un biomarqueur est un processus complexe. Cette qualification est classiquement réalisée selon le modèle ACCE (*Analytic validity, Clinical validity, Clinical utility and associated Ethical, legal and social implications*) (125).

Il doit être mesuré avec fiabilité, précision et de façon reproductible. Ces qualités sont regroupées dans la notion de validité analytique. On distingue aussi la validité clinique, qui est la capacité du test à prédire de manière précise et reproductible un sous-groupe de patients à risque ou de prévoir une évolution clinique liée ou non à un traitement. Le niveau ultime de qualification d'un biomarqueur est son utilité clinique. Pour cela, on évalue la capacité du test à améliorer le pronostic (ex: augmenter la survie), à reclassifier le risque par rapport à des outils existant, à changer la décision médicale ou à prédire qui va bénéficier d'une intervention thérapeutique (126).

Le préalable nécessaire à ce modèle de validation est la maîtrise des paramètres pré-analytiques. Dans le cadre des analyses de l'ADNc, le type de tube de prélèvement, les conditions de transport, et de stockage, de centrifugation de l'échantillon impactent la qualité et la quantité de ce biomarqueur. L'homogénéisation de ces paramètres reste encore un élément primordial à opérer. A ce titre, une initiative internationale doit être mentionnée. Le CANCER-ID est un consortium formé par la Innovative Medicine Initiative (IMI) et financé par l'Union Européenne. Il regroupe 33 partenaires de 13 pays visant à établir des protocoles

standard pour la validation clinique des biomarqueurs circulant. Il regroupe des acteurs académiques et industriels et des compagnies pharmaceutiques (127).

La validité analytique de l'approche ADNct est communément évalué dans les études par la concordance entre les mutations détectées dans l'ADNct et le tissu tumoral. A ce titre, nous avons montré des concordances variant de 0 à 100% pour les patients entre la tumeur et le plasma. Cette approche nécessaire est imparfaite puisque l'hétérogénéité tumorale, la date de la biopsie par rapport à l'échantillon sanguin testé, le stade tumoral et les concentrations d'ADNc affectent ces paramètres. Ainsi la discordance ADNct et tissu tumoral peut être expliquée aussi bien par des facteurs analytiques que biologiques. Les futures études testant la validité analytique d'une technologie donnée basée sur l'ADNct test devront inclure l'évaluation d'échantillons standardisés, avec des mutations spécifiques dont la fréquence allélique est connue.

La validité clinique de l'identification de mutations somatiques à partir de l'ADNct en tant que biomarqueur est un processus déjà avancé puisqu'un test d'identification de mutation du gène *EGFR* basé sur l'ADNct a été approuvé initialement par l'EMA puis la FDA en 2016. Il s'agit du test *cobas® EGFR Mutation Test v2*. Ce test compagnon est indiqué pour la sélection des patients pouvant bénéficier de l'erlotinib (TARCEVA®) en cas de délétion de l'exon 20 ou de mutation L858R ou de l'omisertinib (TAGRISSO®) en cas d'identification de mutation T790M. Il s'agit d'une extension d'indication de ce test déjà approuvé sur tissu tumoral. L'identification des mutations de l'*EGFR* dans l'ADNct est prédictive d'une meilleure survie sans progression pour les patients recevant l'erlotinib par comparaison avec la chimiothérapie. Dans le cas de l'identification de la mutation T790M, ce test n'est indiqué que lorsqu'une biopsie tumorale n'est pas possible. Dans les 2 indications, en cas de résultat négatif, un test de l'échantillon tumoral doit être réalisé.

De nombreux autres essais sont en cours pour démontrer la validité clinique de l'analyse de l'ADNct dans d'autres types tumoraux. On peut citer par exemple un essai prospectif américain dans le cancer du sein (NCT02743910) en situation néo-adjuvante. L'objectif est d'évaluer les modifications de l'ADNct en cours de chimiothérapie et de corréler la réponse complète dite « liquide » avec la réponse pathologique complète histologique.

L'utilité clinique des analyses basée sur l'ADNct reste à établir. Le développement d'essais randomisés comparant une décision thérapeutique basée sur l'ADNct *versus* une attitude standard, sont primordiaux. Plusieurs essais de ce type sont en cours.

L'essai DYNAMIC (Circulating tumour DNA (ctDNA) analysis informing adjuvant chemotherapy in Stage II Colon Cancer) (ACTRN12615000381583) est un essai thérapeutique australien compare 2 stratégies d'indication de traitement adjuvant pour des cancers du côlon stade II opérés. Les patients du groupe expérimental auront une détection d'ADNct post-opératoire et la décision de réaliser une chimiothérapie adjuvante sera fonction de la détection ou non du biomarqueur. Le bras comparatif sera une décision de chimiothérapie adjuvante basée sur les facteurs standards actuels. L'objectif principal est de savoir si une décision médicale de chimiothérapie adjuvante basée sur des résultats d'ADNct impacte le nombre de chimiothérapie réalisée en comparaison avec une attitude standard et la survie sans récurrence.

2. Analyse de l'ADNct dans divers fluides biologiques.

Nous avons analysé les mutations dans l'ADNct extrait du plasma. De façon intéressante pour une patiente de cette cohorte (patiente #6), de l'ADN extrait d'un liquide pleural a été collecté. L'extraction d'ADNct à partir de ce liquide pleural a permis d'identifier les mêmes mutations *PIK3CA* (N1044S) et *KRAS* (G12S) présentes dans la tumeur et dans l'ADNct (donnée non publiées).

La présence d'ADNct dans d'autres fluides biologiques tels que les urines, la salive est une observation ancienne.

Il y a plus de 20 ans, Zhang a identifié des fragments d'ADN issus de chromosome Y dans les urines de patientes ayant reçu une greffe rénale d'un donneur masculin (128). Dix ans plus tard, le mécanisme de filtration trans-rénale de l'ADNc (clairance de l'ADNc) a été identifié, expliquant la présence d'ADN trans-rénal dans les urines (54). L'urine est donc une source potentielle d'ADNct qui peut être collectée de manière véritablement non invasive.

Les études sont relativement peu nombreuses et les études comparatives tumeur, plasma et urine suggèrent une bonne concordance entre ces 3 sources biologiques au sein d'un même patient avec une sensibilité relativement similaire (56, 129). Une étude récente illustre la potentialité de l'ADNct isolé dans les urines en monitorant les mutations de l'*EGFR* détectées dans les urines de patient traités pour un cancer bronchique par osimertinib (130). Les auteurs décrivent la présence d'une augmentation rapide des concentrations des mutations suggérant une apoptose massive puis une diminution des fragments mutés dans les urines. Cette étude est l'une des premières réalisant ce type de suivi.

L'obstacle principal au développement de cette approche est la concentration d'ADNc urinaire plus faible que dans le plasma, en partie expliquées par l'activité urinaire de DNase 100 fois plus importante que dans le plasma (131). Ainsi, l'ADNc urinaire est aussi très fragmenté, avec des études réalisées chez la femme enceinte retrouvant des fragments inférieurs à 100 pdb avec un pic à 29 pdb (55). Plusieurs études sont en néanmoins cours, notamment dans le cadre de la surveillance de cancers bronchiques opérés (NCT02696525) ou pour la détection de mutations des gènes IDH chez des patients suivis pour des gliomes de bas grade (NCT02597335).

Le LCR représente un autre fluide biologique potentiellement intéressant. Les travaux de Bettgowda ont montré que de l'ADNct était détectable dans moins de 10% des patients atteints de gliomes avec des concentrations faibles rendant difficile une réelle application clinique à la différence des autres types tumoraux (44). De la même manière, des concentrations très faibles d'ADNct ont été retrouvées pour les patients présentant uniquement des métastases cérébrales (114, 132). L'explication communément admise est la présence de la barrière hémato-encéphalique qui gêne le relargage dans le plasma des fragments d'ADN tumoral.

Par opposition au plasma, le LCR, secrété par le plexus choroïde et en contact direct avec les cellules cérébrales incluant les cellules tumorales. Il semble relativement enrichi en ADNct avec dans certains cas des fréquences alléliques au-delà de 50% (132-134). Les travaux les plus récents ont montré la possibilité de détecter des mutations dans plus de 50% de patients suivis pour un gliome, de mettre en évidence des mutations restreintes au LCR et de détecter des effets pharmacologiques d'une drogue comme le temozolomide par la détection de variants nucléotidiques C>T/G>A spécifiques de la mutagenèse induites par les alkylants (133). Cette approche, certes invasive, représente une alternative intéressante. En effet, les biopsies cérébrales sont des procédures assez lourdes, parfois génératrices d'épisodes hémorragiques avec des conséquences fonctionnelles lourdes. L'approche diagnostique moléculaire sur LCR pourrait présenter une balance bénéfice/risque plus favorable.

3. Problématique des mutations dans l'ADNct avec une fréquence allélique >50%.

La fréquence allélique (FA) correspond à la fréquence d'un allèle donnée par rapport au total des allèles du même gène existant dans un pool génique. Dans l'ADNc, il correspond au ratio entre le nombre d'allèle mutés détecté dans l'ADNc/nombre d'allèle séquencé. Cette fréquence peut théoriquement varier de 0% à 100%, avec dans ce dernier cas la totalité des allèles séquencés considérés comme mutés. Dans le cas de mutations somatiques portant sur un oncogène, celle-ci porte classiquement sur un seul allèle et la fréquence allélique est alors de 50%. Pour les gènes suppresseurs de tumeur, il est classiquement retrouvé une mutation sur un allèle, associée à une inactivation de l'autre allèle par des mécanismes variés tels qu'une mutation de l'autre allèle sur un autre site ou des régulations épigénétiques. Ainsi la fréquence allélique d'une mutation somatique est rarement supérieure à 50% sauf dans le cas d'une mutation germinale associée.

Pourtant, nous rapportons le cas de 4 patients pour lesquels les fréquences alléliques des mutations identifiées dans l'ADNct étaient supérieures à 50% :

- Patient # 5 : cancer colorectal avec une mutation *PIK3CA E542K* à une FA de 58%
- Patient # 7 : cancer colorectal avec une mutation *TP53 Y234** à une FA de 57%
- Patient # 26 : cancer colorectal avec une mutation *KRAS Q61H* à une FA 51%
- Patient # 36: cancer colorectal avec une mutation *R175H* à une FA de 60%.

Dans la mesure où l'ADNc ne comporte pas uniquement de l'ADNct, et même dans l'hypothèse improbable où l'ADNct représenterait 100% de la fraction de l'ADNc, l'ensemble des mutations devraient avoir une FA inférieure à 50%.

Plusieurs niveaux d'explications peuvent être avancés. Le premier est la présence dans de la mutation dans le tissu tumoral, associée à des anomalies du nombre de copie des gènes. Si la mutation de l'oncogène se trouve sur une région du génome elle-même amplifiée, le ratio allèle muté/allèle normal devient très supérieur à 1 et la FA peut être supérieur à 50%. Inversement, la mutation d'un gène suppresseur de tumeur peut être associée à une perte d'hétérozygotie par une délétion de l'allèle non muté. Ainsi la FA d'une mutation d'un gène comme *TP53* peut être supérieure à 50% dans l'ADNct. C'est d'ailleurs ce que l'on peut retrouver dans le tissu tumoral.

Très récemment, une hématoïèse clonale a été proposée comme une source potentielle de résultats de séquençage faux positifs à partir de l'ADNc. Les premiers travaux de 2014 ont montré la présence dans les leucocytes de mutations somatiques dans plus de 10% des sujets de plus de 65 ans sans hémopathie pré-identifiée (123). Chez 58 patients porteurs de cancers

bronchiques, le séquençage de l'ADNct ainsi que des leucocytes a montré que pour 2 patients avec une mutation *KRAS G12X* identifiée dans l'ADNct, celle-ci était présente dans les leucocytes (135). Sur les 108 mutations *TP53* identifiées dans l'ADNc, 5 étaient présentes dans les leucocytes de façon concomitante et absentes dans le tissu tumoral. Ce mécanisme ne peut être mis en cause pour les 4 patients avec des FA>50%, ces mutations ayant été identifiées dans le tissu tumoral. En revanche, pour la patiente 9, avec une mutation dans l'ADNc *TP53 Y220C* à une FA de 5,7%, il pourrait s'agir de ce mécanisme, cette mutation n'ayant été retrouvée ni dans le tissu tumoral ni au niveau germinale. Ainsi, le séquençage des leucocytes en association au séquençage de l'ADNc pourrait devenir nécessaire, particulièrement lorsque des mutations intéressant des gènes de l'hématopoïèse sont identifiées.

4. Quelles applications potentielles de l'ADNc à l'ère de l'immuno-oncologie ?

Nous rapportons l'intérêt de l'ADNc dans le contexte du développement de thérapies ciblant une anomalie moléculaire précise. Cette approche suppose l'identification d'une mutation précise pour laquelle un médicament ciblant spécifiquement l'anomalie est développé.

Depuis les 3 dernières années, l'immuno-oncologie s'est considérablement développée avec la mise sur le marché de plusieurs drogues dans des indications thérapeutiques variées. Cet essor a été possible par la mise au point d'inhibiteurs spécifiques de checkpoint ciblant la voie PD1/PDL1 et CTLA4. Ces nouvelles approches posent 2 problèmes. L'évaluation de la réponse tumorale n'est pas toujours aisée avec des phénomènes de pseudo-progression parfois difficiles à distinguer d'une progression ou d'une hyper-progression tumorale (108). Dans ce contexte, l'ADNc représente une approche séduisante et fait l'objet de nombreux développements.

Tout d'abord, l'analyse de l'ADNc permet la détection de la maladie résiduelle qui correspond à une charge tumorale très faible. Plusieurs travaux ont montré que la réponse aux inhibiteurs de point de contrôle était inversement corrélée à la masse tumorale estimée par le niveau de LDH, la taille tumorale ou la présence de métastases hépatiques (136-140). Ainsi, l'efficacité maximale de ces thérapies dans un contexte de masse tumorale faible ouvre

la possibilité en situation adjuvante d'une intervention thérapeutique dans une perspective curative. Un premier essai dans le cancer du sein triple négatif a été initié (NCT03145961). Les patients, à l'issue du traitement bénéficieront d'un screening tous les 3 mois de l'ADNct. En cas d'apparition ou d'augmentation de l'ADNct, les patientes seront randomisée entre une thérapie par pembrolizumab ou une simple surveillance. L'objectif principal de cette étude est de démontrer une diminution de l'ADNct chez les patientes recevant le pembrolizumab.

L'analyse de l'ADNct permet aussi la détection de biomarqueurs prédictifs de l'efficacité de l'immunothérapie tels que la détection de l'instabilité des microsatellites ou la charge mutationnelle. La charge mutationnelle correspond au nombre de mutations non synonymes identifiées dans une tumeur donnée. Les seuils de définition d'une charge mutationnelle élevée varient entre > 5 et >20 mutations par mégabases. Ces mutations augmentent potentiellement le nombre de néoépitopes présent à la surface des cellules tumorales et ainsi leur immunogénicité. La détection de la charge mutationnelle à partir de l'ADNct a été réalisée initialement par une approche de séquençage du génome entier (141). Dans cette étude, la corrélation avec le tissu tumoral était très bonne mais il s'agit d'une technologie couteuse et peu compatible avec un usage en routine clinique. Des approches par séquençage ciblé sont faisable pour déterminer la charge mutationnelle et deux études prospectives ont démontré la corrélation entre une charge mutationnelle élevée basée sur l'ADNc et le bénéfice de l'atezolizumab en terme de survie globale et sans progression dans des cancers bronchiques (142). Dans ces 2 études, la charge mutationnelle élevée était définie par la détection de ≥ 16 SNVs dans 394 gènes ciblés en utilisant le test FoundationACT.

L'instabilité micro satellitaire a aussi émergé comme un marqueur pan-tumeur permettant de prédire le bénéfice des inhibiteurs de checkpoint. L'équipe de MH Stern a mis au point une technique de ddPCR permettant une excellente concordance avec le tissu tumoral et une limite de détection de 0.1% (143).

Le suivi de l'ADNct des patients métastatiques traités par immunothérapie permet d'évaluer l'efficacité des traitements et pourrait permettre de stopper précocement une thérapie inefficace. Deux travaux récents illustrent le potentiel de cette approche.

Les travaux de l'équipe de Curie ont évalué la cinétique de l'ADNc sur une série de 15 patients traités par nivolumab ou pembrolizumab (144). Chez les 10 patients avec des mutations dans l'ADNct détectable lors de l'initiation du traitement, 2 patients ont eu une disparition totale de l'ADNct après 8 semaines de traitement avec pour ces 2 patients une réponse partielle scannographique. Les 8 patients avec des variations plus modérées de la quantité d'ADNct avaient une maladie stable ou progressive.

Des observations similaires ont été faites dans une cohorte de patients traités pour un mélanome avec des inhibiteurs de PD1 (145). Le taux de réponse était de 77% pour les patients ayant une disparition de l'ADNct à 12 semaines versus 6% pour les patients dont l'ADNct restait détectable.

Par ailleurs l'ADNct semble discriminant pour définir les pseudo-progression. Dans une cohorte de 125 patients traités pour un mélanome par anti PD1, les mutations de *BRAF* et *NRAS* ont été suivis dans l'ADNct (142). Parmi ces patients, 29 ont progressé radiologiquement dont 9 avaient une pseudo progression définies comme l'absence de confirmation d'une progression radiologique lors de l'évaluation suivante. Parmi ces 9 patients, tous avaient un profil favorable d'évolution de l'ADNct défini comme l'absence de mutations identifiées à baseline ou une diminution de plus de 10 fois de la fréquence allélique des mutations.

Ces études « preuve de principe » démontrent que des modifications précoces de l'ADNct sont associées à la réponse à l'immunothérapie. Compte tenu des relativement faibles effectifs, des études portant sur de plus larges cohortes sont nécessaires.

Travaux en cours et perspectives.

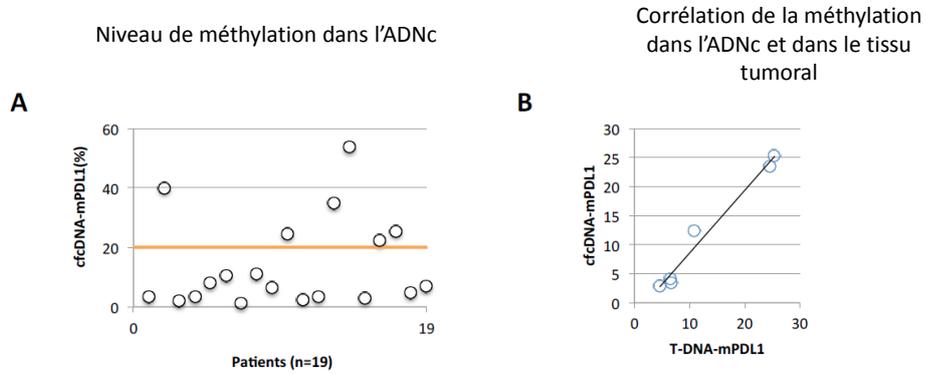
Le séquençage de l'ADNct est désormais une technologie implantée au sein de l'ICO en routine diagnostique ainsi que dans le cadre de la recherche. En parallèle, le développement d'approche de type PCR digitale a été mis en place et notamment la détection des mutations *ESR1* dans les cancers du sein (Pr A Morel).

A mon retour au sein de l'ICO, j'ai rejoint l'équipe de PF Cartron dont la thématique de recherche est l'étude des mécanismes moléculaires de méthylation/déméthylation de l'ADN et le développement de stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses utilisant des "epidrugs". L'objectif de notre binôme « médecin-chercheur » est désormais l'étude des variations et des modifications épigénétiques observées dans l'ADNc dans plusieurs tumeurs types tumoraux, au diagnostic et au cours de l'histoire naturelle de la maladie. Cette collaboration repose sur bio collection spécifique appelée ICO-Circ dans laquelle le plasma des patients de l'ICO est collecté au diagnostic et au cours de l'histoire naturelle de la maladie et des traitements reçus. Elle a été mise en place par mes soins depuis 2015.

Les premiers travaux ont été réalisé chez des patients porteurs de glioblastome. Le traitement de cette tumeur au pronostic sombre, repose sur une association de radiothérapie et de chimiothérapie par Temozolomide. Il s'agit du traitement standard qui n'a pas évolué depuis plus de 10 ans avec des médianes de survie d'environ 18 mois. Plusieurs essais d'immunothérapie sont en cours dans cette pathologie avec des résultats discordants et de manière générale, le statut PD1-PDL1 comme marqueur théranostique pour les inhibiteurs de PD1-PDL1 est imparfait. Notre hypothèse de travail est que la détermination du statut de méthylation de PDL-1 dans l'ADNc est un biomarqueur d'intérêt.

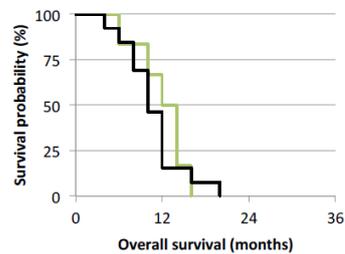
Dans une cohorte de 19 patients, traités pour un glioblastome par radio-chimiothérapie, le niveau de méthylation du promoteur de PDL1 dans l'ADNc a été déterminé par une technique de « Methylation Sensitive Restriction Enzyme ». Cette approche utilise des enzymes de restrictions sensible à la méthylation : quand un ilot CpG est méthylé, l'enzyme clive l'ADNc et les produits de PCR sont abolis. Le niveau de méthylation est exprimé en pourcentage par rapport à un témoin dont le niveau de standard est de 100%. Dans cette cohorte, 6 patients avaient un niveau de méthylation de PDL1 considéré comme élevé (seuil 20%) et donc une potentielle absence d'expression de PDL1. Pour les 6 patients dont la tumeur était disponible, la corrélation méthylation PDL1 dans l'ADNc et dans la tumeur était excellente.

Figure 26. Niveau de méthylation du promoteur de PDL1 dans l'ADNc de patients et corrélation avec le niveau de méthylation dans le tissu tumoral.



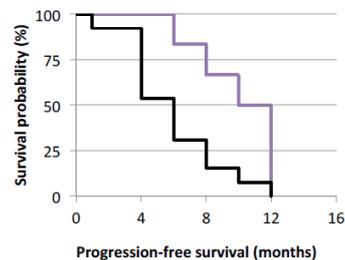
Le statut PDL1 dans l'ADNc a ensuite été corrélé aux données de survie. Pour les patients dont la méthylation de PDL1 était élevée la survie sans progression était significativement meilleure : 11,9 mois versus 6,8 mois, $p=0,0333$. La survie globale n'était pas statistiquement différente : 14 mois versus 11,4 mois, $p=0,55$.

Survie Globale selon le niveau de méthylation de PDL1 dans l'ADNc



Parameter	n	Median (months)	Log-rang test
High mPDL1 (>20%)	6	14	p=0.5500
Low T-PDL1 (≤20%)	13	11.4	

Survie sans progression selon le niveau de méthylation de PDL1 dans l'ADNc



Parameter	n	Median (months)	Log-rang test
High mPDL1 (>20%)	6	11.9	p=0.0333
Low T-PDL1 (≤20%)	13	6.8	

Ce travail est en cours de révision : PD-L1 methylation in tumor and circulating tumor DNA predicts outcome in glioblastoma patients. Arulraj Nadaradjane, Joséphine Briand, Gwenola Bougras-Cartron, Valentine Disdero, Lisenn Lalier-Bretauudeau, Marie-Pierre Joalland, Didier Lanoé, François M Vallette, Jean-Sébastien Frenel, and Pierre-François Cartron. (In revision)

Le même type d'approche est développée dans le contexte des cancers ovariens traités par inhibiteur de PARP.

Le programme 2OTEC (optimisation du traitement par olaparib au travers de considérations épigénétiques) a été financé par un appel d'offre du canceropôle grand ouest. Dans ce programme, toutes les patients recevant un inhibiteur de PARP dans le cadre du soin courant ou d'un essai thérapeutique ont une collecte de plasma jusqu'à progression. Le but de ce programme est de développer des combinaisons de traitement avec les inhibiteurs de PARP. A l'heure actuelle, 7 patientes sont incluses et en cours de recueil.

Bibliographie

1. Frenel JS, Carreira S, Goodall J, Roda D, Perez-Lopez R, Tunariu N, et al. Serial Next-Generation Sequencing of Circulating Cell-Free DNA Evaluating Tumor Clone Response To Molecularly Targeted Drug Administration. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015 Oct 15;21(20):4586-96. PubMed PMID: 26085511. Pubmed Central PMCID: 4580992.
2. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma DNA sanguin chez l'Homme. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales*. 1948 Feb;142(3-4):241-3. PubMed PMID: 18875018. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme.
3. Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation*. 1966 Nov;45(11):1732-40. PubMed PMID: 4959277. Pubmed Central PMCID: 292857.
4. Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG. The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *The Journal of clinical investigation*. 1973 Jan;52(1):198-204. PubMed PMID: 4629907. Pubmed Central PMCID: 302243.
5. Steinman CR. Free DNA in serum and plasma from normal adults. *The Journal of clinical investigation*. 1975 Aug;56(2):512-5. PubMed PMID: 1150882. Pubmed Central PMCID: 436612.
6. Bendich A, Wilczok T, Borenfreund E. Circulating DNA as a Possible Factor in Oncogenesis. *Science*. 1965 Apr 16;148(3668):374-6. PubMed PMID: 14261529.
7. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer research*. 1977 Mar;37(3):646-50. PubMed PMID: 837366.
8. Beljanski M, Bourgarel P, Beljanski M. Correlation between in vitro DNA synthesis, DNA strand separation and in vivo multiplication of cancer cells. *Experimental cell biology*. 1981;49(4):220-31. PubMed PMID: 7250482.
9. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*. 1989;46(5):318-22. PubMed PMID: 2779946.
10. Sorenson GD. Detection of mutated KRAS2 sequences as tumor markers in plasma/serum of patients with gastrointestinal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000 Jun;6(6):2129-37. PubMed PMID: 10873061.
11. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nature medicine*. 1996 Sep;2(9):1035-7. PubMed PMID: 8782464.
12. Chen X, Bonnefoi H, Diebold-Berger S, Lyautey J, Lederrey C, Faltin-Traub E, et al. Detecting tumor-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1999 Sep;5(9):2297-303. PubMed PMID: 10499596.
13. Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer metastasis reviews*. 1999;18(1):65-73. PubMed PMID: 10505546.
14. Chang CP, Chia RH, Wu TL, Tsao KC, Sun CF, Wu JT. Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2003 Jan;327(1-2):95-101. PubMed PMID: 12482623.
15. Hu L, Chen G, Yu H, Qiu X. Clinicopathological significance of RASSF1A reduced expression and hypermethylation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology international*. 2010 Jan 29;4(1):423-32. PubMed PMID: 20305761. Pubmed Central PMCID: 2836437.

16. Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GD. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas*. 1998 Jul;17(1):89-97. PubMed PMID: 9667526.
17. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer research*. 2001 Feb 15;61(4):1659-65. PubMed PMID: 11245480.
18. Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *European journal of cancer & clinical oncology*. 1987 Jun;23(6):707-12. PubMed PMID: 3653190.
19. Rumore PM, Steinman CR. Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *The Journal of clinical investigation*. 1990 Jul;86(1):69-74. PubMed PMID: 2365827. Pubmed Central PMCID: 296691.
20. Thierry AR, Mouliere F, Gongora C, Ollier J, Robert B, Ychou M, et al. Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic acids research*. 2010 Oct;38(18):6159-75. PubMed PMID: 20494973. Pubmed Central PMCID: 2952865.
21. Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PloS one*. 2011;6(9):e23418. PubMed PMID: 21909401. Pubmed Central PMCID: 3167805.
22. Jiang P, Lo YM. The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics. *Trends in genetics : TIG*. 2016 Apr 26. PubMed PMID: 27129983.
23. Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clinical chemistry*. 2004 Jan;50(1):88-92. PubMed PMID: 14709639.
24. Wang BG, Huang HY, Chen YC, Bristow RE, Kassaei K, Cheng CC, et al. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer research*. 2003 Jul 15;63(14):3966-8. PubMed PMID: 12873992.
25. Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ, et al. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clinical chemistry*. 2006 Jun;52(6):1062-9. PubMed PMID: 16723681.
26. Gao YJ, He YJ, Yang ZL, Shao HY, Zuo Y, Bai Y, et al. Increased integrity of circulating cell-free DNA in plasma of patients with acute leukemia. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2010 Nov;48(11):1651-6. PubMed PMID: 20831457.
27. Chan KC, Leung SF, Yeung SW, Chan AT, Lo YM. Persistent aberrations in circulating DNA integrity after radiotherapy are associated with poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008 Jul 1;14(13):4141-5. PubMed PMID: 18593992.
28. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Nov 8;102(45):16368-73. PubMed PMID: 16258065. Pubmed Central PMCID: 1283450.
29. Mouliere F, El Messaoudi S, Gongora C, Guedj A-S, Robert B, Del Rio M, et al. Circulating Cell-Free DNA from Colorectal Cancer Patients May Reveal High KRAS or BRAF Mutation Load. *Translational Oncology*. 2013;6(3):319-IN8.
30. Dennin RH. DNA of free and complexed origin in human plasma: concentration and length distribution. *Klinische Wochenschrift*. 1979 May 3;57(9):451-6. PubMed PMID: 449255.
31. Mouliere F, El Messaoudi S, Pang D, Dritschilo A, Thierry AR. Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. *Molecular oncology*. 2014 Jul;8(5):927-41. PubMed PMID: 24698732.

32. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by paired-end sequencing. *Clinical chemistry*. 2010 Aug;56(8):1279-86. PubMed PMID: 20558635.
33. Zheng YW, Chan KC, Sun H, Jiang P, Su X, Chen EZ, et al. Nonhematopoietically derived DNA is shorter than hematopoietically derived DNA in plasma: a transplantation model. *Clinical chemistry*. 2012 Mar;58(3):549-58. PubMed PMID: 22052939.
34. Lo YM, Chan KC, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Science translational medicine*. 2010 Dec 8;2(61):61ra91. PubMed PMID: 21148127.
35. Jiang P, Chan CW, Chan KC, Cheng SH, Wong J, Wong VW, et al. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015 Mar 17;112(11):E1317-25. PubMed PMID: 25646427. Pubmed Central PMCID: 4372002.
36. Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S, Welker NC, Daza R, Baker DN, et al. Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS genetics*. 2016 Jul;12(7):e1006162. PubMed PMID: 27428049. Pubmed Central PMCID: 4948782.
37. Cheng SH, Jiang P, Sun K, Cheng YK, Chan KC, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal testing by nanopore sequencing of maternal plasma DNA: feasibility assessment. *Clinical chemistry*. 2015 Oct;61(10):1305-6. PubMed PMID: 26286915.
38. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2001 Nov;313(1-2):139-42. PubMed PMID: 11694251.
39. Rykova EY, Laktionov PP, Skvortsova TE, Starikov AV, Kuznetsova NP, Vlassov VV. Extracellular DNA in breast cancer: Cell-surface-bound, tumor-derived extracellular DNA in blood of patients with breast cancer and nonmalignant tumors. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004 Jun;1022:217-20. PubMed PMID: 15251963.
40. Holdenrieder S, Stieber P, Chan LY, Geiger S, Kremer A, Nagel D, et al. Cell-free DNA in serum and plasma: comparison of ELISA and quantitative PCR. *Clinical chemistry*. 2005 Aug;51(8):1544-6. PubMed PMID: 16040855.
41. Fournie GJ, Courtin JP, Laval F, Chale JJ, Pourrat JP, Pujazon MC, et al. Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours. *Cancer letters*. 1995 May 8;91(2):221-7. PubMed PMID: 7767913.
42. Lehmann-Werman R, Neiman D, Zemmour H, Moss J, Magenheimer J, Vaknin-Dembinsky A, et al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016 Mar 29;113(13):E1826-34. PubMed PMID: 26976580. Pubmed Central PMCID: 4822610.
43. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell*. 2016 Jan 14;164(1-2):57-68. PubMed PMID: 26771485. Pubmed Central PMCID: 4715266.
44. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science translational medicine*. 2014 Feb 19;6(224):224ra24. PubMed PMID: 24553385. Pubmed Central PMCID: 4017867.
45. Choi JJ, Reich CF, 3rd, Pisetsky DS. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology*. 2005 May;115(1):55-62. PubMed PMID: 15819697. Pubmed Central PMCID: 1782131.

46. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Mulcahy HE, Anker P. Alu repeat sequences are present in increased proportions compared to a unique gene in plasma/serum DNA: evidence for a preferential release from viable cells? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001 Sep;945:258-64. PubMed PMID: 11708488.
47. Kahlerlert C, Melo SA, Protopopov A, Tang J, Seth S, Koch M, et al. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *The Journal of biological chemistry*. 2014 Feb 14;289(7):3869-75. PubMed PMID: 24398677. Pubmed Central PMCID: 3924256.
48. San Lucas FA, Allenson K, Bernard V, Castillo J, Kim DU, Ellis K, et al. Minimally invasive genomic and transcriptomic profiling of visceral cancers by next-generation sequencing of circulating exosomes. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2016 Apr;27(4):635-41. PubMed PMID: 26681674. Pubmed Central PMCID: 4803451.
49. Mohrmann L, Huang HJ, Hong DS, Tsimberidou AM, Fu S, Piha-Paul SA, et al. Liquid Biopsies Using Plasma Exosomal Nucleic Acids and Plasma Cell-Free DNA Compared with Clinical Outcomes of Patients with Advanced Cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2018 Jan 1;24(1):181-8. PubMed PMID: 29051321. Pubmed Central PMCID: 5754253.
50. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *American journal of human genetics*. 1999 Jan;64(1):218-24. PubMed PMID: 9915961. Pubmed Central PMCID: 1377720.
51. Yu SC, Lee SW, Jiang P, Leung TY, Chan KC, Chiu RW, et al. High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing. *Clinical chemistry*. 2013 Aug;59(8):1228-37. PubMed PMID: 23603797.
52. To EW, Chan KC, Leung SF, Chan LY, To KF, Chan AT, et al. Rapid clearance of plasma Epstein-Barr virus DNA after surgical treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003 Aug 15;9(9):3254-9. PubMed PMID: 12960110.
53. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature medicine*. 2008 Sep;14(9):985-90. PubMed PMID: 18670422. Pubmed Central PMCID: 2820391.
54. Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, Shelepov V, Alechina R, Molyaka Y, et al. Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. *Clinical chemistry*. 2000 Aug;46(8 Pt 1):1078-84. PubMed PMID: 10926886.
55. Tsui NB, Jiang P, Chow KC, Su X, Leung TY, Sun H, et al. High resolution size analysis of fetal DNA in the urine of pregnant women by paired-end massively parallel sequencing. *PloS one*. 2012;7(10):e48319. PubMed PMID: 23118982. Pubmed Central PMCID: 3485143.
56. Reckamp KL, Melnikova VO, Karlovich C, Sequist LV, Camidge DR, Wakelee H, et al. A Highly Sensitive and Quantitative Test Platform for Detection of NSCLC EGFR Mutations in Urine and Plasma. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2016 Oct;11(10):1690-700. PubMed PMID: 27468937.
57. Merker JD, Oxnard GR, Compton C, Diehn M, Hurley P, Lazar AJ, et al. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2018 Jun 1;36(16):1631-41. PubMed PMID: 29504847.
58. Parpart-Li S, Bartlett B, Popoli M, Adleff V, Tucker L, Steinberg R, et al. The Effect of Preservative and Temperature on the Analysis of Circulating Tumor DNA. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2017 May 15;23(10):2471-7. PubMed PMID: 27827317.
59. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2013 Sep 23;424:222-30. PubMed PMID: 23727028.

60. Lam NY, Rainer TH, Chiu RW, Lo YM. EDTA is a better anticoagulant than heparin or citrate for delayed blood processing for plasma DNA analysis. *Clinical chemistry*. 2004 Jan;50(1):256-7. PubMed PMID: 14709670.
61. Toro PV, Erlanger B, Beaver JA, Cochran RL, VanDenBerg DA, Yakim E, et al. Comparison of cell stabilizing blood collection tubes for circulating plasma tumor DNA. *Clinical biochemistry*. 2015 Oct;48(15):993-8. PubMed PMID: 26234639. Pubmed Central PMCID: 4600652.
62. Kang Q, Henry NL, Paoletti C, Jiang H, Vats P, Chinnaiyan AM, et al. Comparative analysis of circulating tumor DNA stability In K3EDTA, Streck, and CellSave blood collection tubes. *Clinical biochemistry*. 2016 Dec;49(18):1354-60. PubMed PMID: 27129799.
63. Parpart-Li S, Bartlett B, Popoli M, Adleff V, Tucker L, Steinberg R, et al. The Effect of Preservative and Temperature on the Analysis of Circulating Tumor DNA. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016 Nov 08. PubMed PMID: 27827317.
64. Browne CD, Mattmann ME, Wycoco MJ, Chen SN, Ravichandran R, Desharnais J, et al. Abstract 2758: Comparison of cell-free DNA blood collection tubes. *Cancer research*. 2017;77(13 Supplement):2758-.
65. Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V, Roeyen G, Lardon F, Rolfo C, et al. A Comparison of Cell-Free DNA Isolation Kits: Isolation and Quantification of Cell-Free DNA in Plasma. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2017 Jan;19(1):162-8. PubMed PMID: 27865784.
66. Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, Jones G, Cowen S, Foy CA, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2014 Oct;406(26):6499-512. PubMed PMID: 24853859. Pubmed Central PMCID: 4182654.
67. Page K, Guttery DS, Zahra N, Primrose L, Elshaw SR, Pringle JH, et al. Influence of plasma processing on recovery and analysis of circulating nucleic acids. *PloS one*. 2013;8(10):e77963. PubMed PMID: 24205045. Pubmed Central PMCID: 3799744.
68. Mauger F, Dulary C, Daviaud C, Deleuze JF, Tost J. Comprehensive evaluation of methods to isolate, quantify, and characterize circulating cell-free DNA from small volumes of plasma. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2015 Sep;407(22):6873-8. PubMed PMID: 26123439.
69. Beranek M, Sirak I, Vosmik M, Petera J, Drastikova M, Palicka V. Carrier molecules and extraction of circulating tumor DNA for next generation sequencing in colorectal cancer. *Acta medica*. 2016;59(2):54-8. PubMed PMID: 27526306.
70. Riva F, Dronov OI, Khomenko DI, Huguet F, Louvet C, Mariani P, et al. Clinical applications of circulating tumor DNA and circulating tumor cells in pancreatic cancer. *Molecular oncology*. 2016 Mar;10(3):481-93. PubMed PMID: 26856794.
71. Day E, Dear PH, McCaughan F. Digital PCR strategies in the development and analysis of molecular biomarkers for personalized medicine. *Methods*. 2013 Jan;59(1):101-7. PubMed PMID: 22926236.
72. Couraud S, Vaca-Paniagua F, Villar S, Oliver J, Schuster T, Blanche H, et al. Noninvasive diagnosis of actionable mutations by deep sequencing of circulating free DNA in lung cancer from never-smokers: a proof-of-concept study from BioCAST/IFCT-1002. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014 Sep 1;20(17):4613-24. PubMed PMID: 25013125.
73. Uchida J, Kato K, Kukita Y, Kumagai T, Nishino K, Daga H, et al. Diagnostic Accuracy of Noninvasive Genotyping of EGFR in Lung Cancer Patients by Deep Sequencing of Plasma Cell-Free DNA. *Clinical chemistry*. 2015 Sep;61(9):1191-6. PubMed PMID: 26206882.
74. Pecuchet N, Rozenholc Y, Zonta E, Pietrasz D, Didelot A, Combe P, et al. Analysis of Base-Position Error Rate of Next-Generation Sequencing to Detect Tumor Mutations in Circulating DNA. *Clinical chemistry*. 2016 Nov;62(11):1492-503. PubMed PMID: 27624137.

75. Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NC, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nature medicine*. 2014 May;20(5):548-54. PubMed PMID: 24705333. Pubmed Central PMCID: 4016134.
76. Phallen J, Sausen M, Adleff V, Leal A, Hruban C, White J, et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Science translational medicine*. 2017 Aug 16;9(403). PubMed PMID: 28814544.
77. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*. 2013 May 02;497(7447):108-12. PubMed PMID: 23563269.
78. Shaw JA, Page K, Blighe K, Hava N, Guttery D, Ward B, et al. Genomic analysis of circulating cell-free DNA infers breast cancer dormancy. *Genome research*. 2012 Feb;22(2):220-31. PubMed PMID: 21990379. Pubmed Central PMCID: 3266030.
79. Heitzer E, Ulz P, Belic J, Gutsch S, Quehenberger F, Fischereeder K, et al. Tumor-associated copy number changes in the circulation of patients with prostate cancer identified through whole-genome sequencing. *Genome medicine*. 2013;5(4):30. PubMed PMID: 23561577. Pubmed Central PMCID: 3707016.
80. Heitzer E, Auer M, Hoffmann EM, Pichler M, Gasch C, Ulz P, et al. Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA of patients with cancer. *International journal of cancer*. 2013 Jul 15;133(2):346-56. PubMed PMID: 23319339. Pubmed Central PMCID: 3708119.
81. Adalsteinsson VA, Ha G, Freeman SS, Choudhury AD, Stover DG, Parsons HA, et al. Scalable whole-exome sequencing of cell-free DNA reveals high concordance with metastatic tumors. *Nature communications*. 2017 Nov 6;8(1):1324. PubMed PMID: 29109393. Pubmed Central PMCID: 5673918.
82. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000618/WC500033994.pdf.
83. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/004124/WC500202022.pdf.
84. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/001016/WC500036358.pdf.
85. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpma/pma.cfm?id=P150047>.
86. Wu YL, Zhou C, Liam CK, Wu G, Liu X, Zhong Z, et al. First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: analyses from the phase III, randomized, open-label, ENSURE study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2015 Sep;26(9):1883-9. PubMed PMID: 26105600.
87. <https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm504540.htm>.
88. Goss G, Tsai CM, Shepherd FA, Bazhenova L, Lee JS, Chang GC, et al. Osimertinib for pretreated EGFR Thr790Met-positive advanced non-small-cell lung cancer (AURA2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2016 Dec;17(12):1643-52. PubMed PMID: 27751847.
89. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, Lawrance R, Paweletz CP, Cantarini M, et al. Association Between Plasma Genotyping and Outcomes of Treatment With Osimertinib (AZD9291) in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016 Oct 1;34(28):3375-82. PubMed PMID: 27354477. Pubmed Central PMCID: 5035123.
90. Douillard. Gefitinib Treatment in EGFR Mutated Caucasian NSCLC Circulating-Free Tumor DNA as a Surrogate for Determination of EGFR Status.
91. Thierry AR, Moulriere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nature medicine*. 2014 Apr;20(4):430-5. PubMed PMID: 24658074.

92. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*. 2012 Jun 28;486(7404):532-6. PubMed PMID: 22722830. Pubmed Central PMCID: 3927413.
93. Diaz LA, Jr., Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*. 2012 Jun 28;486(7404):537-40. PubMed PMID: 22722843. Pubmed Central PMCID: 3436069.
94. Toy W, Shen Y, Won H, Green B, Sakr RA, Will M, et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nature genetics*. 2013 Dec;45(12):1439-45. PubMed PMID: 24185512. Pubmed Central PMCID: 3903423.
95. Jeselsohn R, Buchwalter G, De Angelis C, Brown M, Schiff R. ESR1 mutations-a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Nature reviews Clinical oncology*. 2015 Oct;12(10):573-83. PubMed PMID: 26122181.
96. Schiavon G, Hrebien S, Garcia-Murillas I, Cutts RJ, Pearson A, Tarazona N, et al. Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer. *Science translational medicine*. 2015 Nov 11;7(313):313ra182. PubMed PMID: 26560360. Pubmed Central PMCID: 4998737.
97. Clatot F, Perdrix A, Augusto L, Beaussire L, Delacour J, Calbrix C, et al. Kinetics, prognostic and predictive values of ESR1 circulating mutations in metastatic breast cancer patients progressing on aromatase inhibitor. *Oncotarget*. 2016 Nov 15;7(46):74448-59. PubMed PMID: 27801670.
98. Hortobagyi GN, Chen D, Piccart M, Rugo HS, Burris HA, 3rd, Pritchard KI, et al. Correlative Analysis of Genetic Alterations and Everolimus Benefit in Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer: Results From BOLERO-2. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016 Feb 10;34(5):419-26. PubMed PMID: 26503204.
99. Chandralapaty S, Chen D, He W, Sung P, Samoila A, You D, et al. Prevalence of ESR1 Mutations in Cell-Free DNA and Outcomes in Metastatic Breast Cancer: A Secondary Analysis of the BOLERO-2 Clinical Trial. *JAMA oncology*. 2016 Oct 01;2(10):1310-5. PubMed PMID: 27532364. Pubmed Central PMCID: 5063698.
100. Fribbens C, O'Leary B, Kilburn L, Hrebien S, Garcia-Murillas I, Beaney M, et al. Plasma ESR1 Mutations and the Treatment of Estrogen Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016 Jun 6. PubMed PMID: 27269946.
101. Edwards SL, Brough R, Lord CJ, Natrajan R, Vatcheva R, Levine DA, et al. Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. *Nature*. 2008 Feb 28;451(7182):1111-5. PubMed PMID: 18264088.
102. Barber LJ, Sandhu S, Chen L, Campbell J, Kozarewa I, Fenwick K, et al. Secondary mutations in BRCA2 associated with clinical resistance to a PARP inhibitor. *The Journal of pathology*. 2013 Feb;229(3):422-9. PubMed PMID: 23165508.
103. Lheureux S, Bruce JP, Burnier JV, Karakasis K, Shaw PA, Clarke BA, et al. Somatic BRCA1/2 Recovery as a Resistance Mechanism After Exceptional Response to Poly (ADP-ribose) Polymerase Inhibition. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2017 Apr 10;35(11):1240-9. PubMed PMID: 28221868.
104. Goodall J, Mateo J, Yuan W, Mossop H, Porta N, Miranda S, et al. Circulating Free DNA to Guide Prostate Cancer Treatment with PARP Inhibition. *Cancer discovery*. 2017 Apr 27. PubMed PMID: 28450425.
105. Quigley D, Alumkal JJ, Wyatt AW, Kothari V, Foye A, Lloyd P, et al. Analysis of Circulating Cell-free DNA Identifies Multi-clonal Heterogeneity of BRCA2 Reversion Mutations Associated with Resistance to PARP Inhibitors. *Cancer discovery*. 2017 Apr 27. PubMed PMID: 28450426.
106. Weigelt B, Comino-Mendez I, de Bruijn I, Tian L, Meisel JL, Garcia-Murillas I, et al. Diverse BRCA1 and BRCA2 Reversion Mutations in Circulating Cell-Free DNA of Therapy-Resistant Breast or Ovarian Cancer. *Clinical*

cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2017 Aug 01. PubMed PMID: 28765325.

107. Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Constantin T, Salari R, et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature*. 2017 Apr 26;545(7655):446-51. PubMed PMID: 28445469. Pubmed Central PMCID: 5812436.

108. Nishino M, Ramaiya NH, Hatabu H, Hodi FS. Monitoring immune-checkpoint blockade: response evaluation and biomarker development. *Nature reviews Clinical oncology*. 2017 Jun 27. PubMed PMID: 28653677.

109. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2013 Mar 28;368(13):1199-209. PubMed PMID: 23484797.

110. Garlan F, Laurent-Puig P, Sefrioui D, Siauve N, Didelot A, Sarafan-Vasseur N, et al. Early evaluation of circulating tumor DNA as marker of therapeutic efficacy in metastatic colorectal cancer patients (PLACOL study). *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2017 Jun 02. PubMed PMID: 28576867.

111. O'Leary B, Hrebien S, Morden JP, Beaney M, Fribbens C, Huang X, et al. Early circulating tumor DNA dynamics and clonal selection with palbociclib and fulvestrant for breast cancer. *Nature communications*. 2018 Mar 1;9(1):896. PubMed PMID: 29497091. Pubmed Central PMCID: 5832789.

112. Marchetti A, Palma JF, Felicioni L, De Pas TM, Chiari R, Del Grammasro M, et al. Early Prediction of Response to Tyrosine Kinase Inhibitors by Quantification of EGFR Mutations in Plasma of NSCLC Patients. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2015 Oct;10(10):1437-43. PubMed PMID: 26295376.

113. Schreuer M, Meersseman G, Van Den Herrewegen S, Jansen Y, Chevolet I, Bott A, et al. Quantitative assessment of BRAF V600 mutant circulating cell-free tumor DNA as a tool for therapeutic monitoring in metastatic melanoma patients treated with BRAF/MEK inhibitors. *Journal of translational medicine*. 2016 Apr 19;14:95. PubMed PMID: 27095081. Pubmed Central PMCID: 4837559.

114. Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, Ng C, Hrebien S, Cutts RJ, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Science translational medicine*. 2015 Aug 26;7(302):302ra133. PubMed PMID: 26311728.

115. Scholer LV, Reinert T, Orntoft MW, Kassentoft CG, Arnadottir SS, Vang S, et al. Clinical implications of monitoring circulating tumor DNA in patients with colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2017 Jun 09. PubMed PMID: 28600478.

116. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Science translational medicine*. 2016 Jul 6;8(346):346ra92. PubMed PMID: 27384348. Pubmed Central PMCID: 5346159.

117. Gormally E, Vineis P, Matullo G, Veglia F, Caboux E, Le Roux E, et al. TP53 and KRAS2 mutations in plasma DNA of healthy subjects and subsequent cancer occurrence: a prospective study. *Cancer research*. 2006 Jul 01;66(13):6871-6. PubMed PMID: 16818665.

118. Amant F, Verheecke M, Wlodarska I, Dehaspe L, Brady P, Brison N, et al. Presymptomatic Identification of Cancers in Pregnant Women During Noninvasive Prenatal Testing. *JAMA oncology*. 2015 Sep;1(6):814-9. PubMed PMID: 26355862.

119. Lo YM, Chan LY, Lo KW, Leung SF, Zhang J, Chan AT, et al. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer research*. 1999 Mar 15;59(6):1188-91. PubMed PMID: 10096545.

120. Chan KCA, Woo JKS, King A, Zee BCY, Lam WKJ, Chan SL, et al. Analysis of Plasma Epstein-Barr Virus DNA to Screen for Nasopharyngeal Cancer. *The New England journal of medicine*. 2017 Aug 10;377(6):513-22. PubMed PMID: 28792880.
121. Allenson K, Castillo J, San Lucas FA, Scelo G, Kim DU, Bernard V, et al. High prevalence of mutant KRAS in circulating exosome-derived DNA from early-stage pancreatic cancer patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2017 Apr 1;28(4):741-7. PubMed PMID: 28104621. Pubmed Central PMCID: 5834026.
122. Kammesheidt A, Tonozzi TR, Lim SW, Braunstein GD. Mutation detection using plasma circulating tumor DNA (ctDNA) in a cohort of asymptomatic adults at increased risk for cancer. *International journal of molecular epidemiology and genetics*. 2018;9(1):1-12. PubMed PMID: 29531639. Pubmed Central PMCID: 5840340.
123. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *The New England journal of medicine*. 2014 Dec 25;371(26):2477-87. PubMed PMID: 25426838. Pubmed Central PMCID: 4290021.
124. Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science*. 2018 Feb 23;359(6378):926-30. PubMed PMID: 29348365. Pubmed Central PMCID: 6080308.
125. Teutsch SM, Bradley LA, Palomaki GE, Haddow JE, Piper M, Calonge N, et al. The Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Initiative: methods of the EGAPP Working Group. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2009 Jan;11(1):3-14. PubMed PMID: 18813139. Pubmed Central PMCID: 2743609.
126. Merlin J-L. *Les biomarqueurs moléculaires en oncologie*. Paris: Springer; 2014.
127. <https://www.cancer-id.eu/>.
128. Zhang J, Tong KL, Li PK, Chan AY, Yeung CK, Pang CC, et al. Presence of donor- and recipient-derived DNA in cell-free urine samples of renal transplantation recipients: urinary DNA chimerism. *Clinical chemistry*. 1999 Oct;45(10):1741-6. PubMed PMID: 10508119.
129. Hyman DM, Diamond EL, Vibat CR, Hassaine L, Poole JC, Patel M, et al. Prospective blinded study of BRAFV600E mutation detection in cell-free DNA of patients with systemic histiocytic disorders. *Cancer discovery*. 2015 Jan;5(1):64-71. PubMed PMID: 25324352.
130. Husain H, Melnikova VO, Kosco K, Woodward B, More S, Pingle SC, et al. Monitoring Daily Dynamics of Early Tumor Response to Targeted Therapy by Detecting Circulating Tumor DNA in Urine. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2017 Apr 18. PubMed PMID: 28420725.
131. Nadano D, Yasuda T, Kishi K. Measurement of deoxyribonuclease I activity in human tissues and body fluids by a single radial enzyme-diffusion method. *Clinical chemistry*. 1993 Mar;39(3):448-52. PubMed PMID: 8448855.
132. De Mattos-Arruda L, Mayor R, Ng CK, Weigelt B, Martinez-Ricarte F, Torrejon D, et al. Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. *Nature communications*. 2015 Nov 10;6:8839. PubMed PMID: 26554728. Pubmed Central PMCID: 5426516.
133. Pentsova EI, Shah RH, Tang J, Boire A, You D, Briggs S, et al. Evaluating Cancer of the Central Nervous System Through Next-Generation Sequencing of Cerebrospinal Fluid. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016 Jul 10;34(20):2404-15. PubMed PMID: 27161972. Pubmed Central PMCID: 4981784.
134. Wang Y, Springer S, Zhang M, McMahon KW, Kinde I, Dobbyn L, et al. Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid of patients with primary tumors of the brain and spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015 Aug 04;112(31):9704-9. PubMed PMID: 26195750. Pubmed Central PMCID: 4534284.

135. Hu Y, Ulrich BC, Supplee J, Kuang Y, Lizotte PH, Feeney NB, et al. False-Positive Plasma Genotyping Due to Clonal Hematopoiesis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2018 Mar 22. PubMed PMID: 29567812.
136. Huang AC, Postow MA, Orlovski RJ, Mick R, Bengsch B, Manne S, et al. T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature*. 2017 May 4;545(7652):60-5. PubMed PMID: 28397821. Pubmed Central PMCID: 5554367.
137. Joseph RW, Elassaiss-Schaap J, Kefford RF, Hwu WJ, Wolchok JD, Joshua AM, et al. Baseline Tumor Size Is an Independent Prognostic Factor for Overall Survival in Patients With Melanoma Treated With Pembrolizumab. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2018 Apr 23. PubMed PMID: 29685882.
138. Diem S, Kasenda B, Spain L, Martin-Liberal J, Marconcini R, Gore M, et al. Serum lactate dehydrogenase as an early marker for outcome in patients treated with anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma. *British journal of cancer*. 2016 Feb 2;114(3):256-61. PubMed PMID: 26794281. Pubmed Central PMCID: 4742588.
139. Derclé L, Ammari S, Champiat S, Massard C, Ferte C, Taihi L, et al. Rapid and objective CT scan prognostic scoring identifies metastatic patients with long-term clinical benefit on anti-PD-1/L1 therapy. *European journal of cancer*. 2016 Sep;65:33-42. PubMed PMID: 27451022.
140. Tumei PC, Hellmann MD, Hamid O, Tsai KK, Loo KL, Gubens MA, et al. Liver Metastasis and Treatment Outcome with Anti-PD-1 Monoclonal Antibody in Patients with Melanoma and NSCLC. *Cancer immunology research*. 2017 May;5(5):417-24. PubMed PMID: 28411193. Pubmed Central PMCID: 5749922.
141. Koeppel F, Blanchard S, Jovelet C, Genin B, Marcaillou C, Martin E, et al. Whole exome sequencing for determination of tumor mutation load in liquid biopsy from advanced cancer patients. *PLoS one*. 2017;12(11):e0188174. PubMed PMID: 29161279. Pubmed Central PMCID: 5697854.
142. Gandara DR, Paul SM, Kowanetz M, Schleifman E, Zou W, Li Y, et al. Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab. *Nature medicine*. 2018 Aug 6. PubMed PMID: 30082870.
143. Stern M-HeaDMpicbDCR, 4599 (2018).
144. Cabel L, Riva F, Servois V, Livartowski A, Daniel C, Rampanou A, et al. Circulating tumor DNA changes for early monitoring of anti-PD1 immunotherapy: a proof-of-concept study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2017 Apr 29. PubMed PMID: 28459943.
145. Lee JH, Long GV, Boyd S, Lo S, Menzies AM, Tembe V, et al. Circulating tumour DNA predicts response to anti-PD1 antibodies in metastatic melanoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2017 May 01;28(5):1130-6. PubMed PMID: 28327969.

Annexes

Serial Next-Generation Sequencing of Circulating Cell-Free DNA Evaluating Tumor Clone Response To Molecularly Targeted Drug Administration

Jean Sebastien Frene^{1,2}, Suzanne Carreira³, Jane Goodall³, Desam Roda¹, Raquel Perez-Lopez¹, Nina Tunariu¹, Ruth Riisnaes³, Susana Miranda³, Ines Figueiredo³, Daniel Nava-Rodrigues³, Alan Smith¹, Christophe Leux⁴, Isaac Garcia-Murillas⁵, Roberta Ferraldeschi¹, David Lorente¹, Joaquin Mateo¹, Michael Ong¹, Timothy A. Yap¹, Udai Banerji¹, Delila Gasi Tandefelt³, Nick Turner⁵, Gerhardt Attard¹, and Johann S. de Bono¹

Abstract

Purpose: We evaluated whether next-generation sequencing (NGS) of circulating cell-free DNA (cfDNA) could be used for patient selection and as a tumor done response biomarker in patients with advanced cancers participating in early-phase clinical trials of targeted drugs.

Experimental Design: Plasma samples from patients with known tumor mutations who completed at least two courses of investigational targeted therapy were collected monthly, until disease progression. NGS was performed sequentially on the Ion Torrent PGM platform.

Results: cfDNA was extracted from 39 patients with various tumor types. Treatments administered targeted mainly the PI3K-AKT-mTOR pathway ($n = 28$) or MEK ($n = 7$). Overall, 159 plasma samples were sequenced with a mean sequencing coverage achieved of 1,685X across experiments. At trial initiation (C1D1), 23 of 39 (59%) patients had at least one muta-

tion identified in cfDNA (mean 2, range 1–5). Out of the 44 mutations identified at C1D1, *TP53*, *PIK3CA* and *KRAS* were the top 3 mutated genes identified, with 18 (41%), 9 (20%), 8 (18%) different mutations, respectively. Out of these 23 patients, 13 received a targeted drug matching their tumor profile. For the 23 patients with cfDNA mutation at C1D1, the monitoring of mutation allele frequency (AF) in consecutive plasma samples during treatment with targeted drugs demonstrated potential treatment associated clonal responses. Longitudinal monitoring of cfDNA samples with multiple mutations indicated the presence of separate clones behaving discordantly. Molecular changes at cfDNA mutation level were associated with time to disease progression by RECIST criteria.

Conclusions: Targeted NGS of cfDNA has potential clinical utility to monitor the delivery of targeted therapies. *Clin Cancer Res*; 21(20); 4586–96. ©2015 AACR.

Introduction

Next-generation sequencing (NGS) is becoming a key tool for molecular screening programs in anticancer drug development (1). The identification of patients with oncogenic driver mutations provides the opportunity to use the genomic information of individual tumors to guide the selection of rational therapeutics in an attempt to improve the outcome of patients with advanced cancers (2). The discovery of genomic aberrations like *BRAF*

mutations and *ALK* rearrangements, and the subsequent accelerated development of vemurafenib or crizotinib for that targeted patient population, is an example of such a successful biomarker-driven drug development (3, 4).

However, the known spatial and temporal heterogeneity of tumors transforms such analyses into a much more complex challenge (5–7). Moreover, patients participating in early-phase clinical trials form a highly heterogeneous cohort comprising a mixture of tumor types, prior treatment exposure, and the presence of multiple sites of disease that may each be molecularly heterogeneous. Thus, the validity of utilizing molecular characterization studies of archival tumor tissue acquired at diagnosis, often several years before, is questionable. In addition, the analysis of one tumor lesion may not provide sufficient information on this heterogeneity, but serial biopsies and sampling multiple lesions remain impractical.

Recent technological advances have delivered on the potential of circulating cell-free DNA (cfDNA) genotyping for the molecular characterization of tumors (8). Proof-of-concept studies have also shown that sequencing cfDNA can reveal important information on tumor-related genetic and epigenetic alterations relevant to oncogenesis and cancer progression (9, 10), tumor heterogeneity (11, 12), and mechanisms of response and resistance to therapy for a given patient (13, 14). In most of the reported studies, only a few mutations or genomic rearrangements have been interrogated

¹The Institute of Cancer Research and the Royal Marsden Hospital, Sutton, Surrey, London, United Kingdom. ²Institut de Cancerologie de l'Ouest, Nantes-Saint Herblain, France. ³The Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, London, United Kingdom. ⁴Département de Santé Publique, CHU de Nantes, Nantes Cedex 1, France. ⁵The Breakthrough Breast Cancer Research Centre, Institute of Cancer Research, London, United Kingdom.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Johann S. de Bono, The Institute of Cancer Research and the Royal Marsden Hospital, Downs Road, Sutton, Surrey, London SM2 5PT, United Kingdom. Phone: 4420-8642-6011; Fax: 4420-8642-7979; E-mail: Johann.de-Bono@icr.ac.uk

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0584

©2015 American Association for Cancer Research.

Annexe 2. Liste des gènes ciblés dans le *Ion Ampliseq Cancer Hotspot Panel v2*.

The Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 targets 50 genes

<i>ABL1</i>	<i>EGFR</i>	<i>GNAS</i>	<i>KRAS</i>	<i>PTPN11</i>
<i>AKT1</i>	<i>ERBB2</i>	<i>GNAQ</i>	<i>MET</i>	<i>RB1</i>
<i>ALK</i>	<i>ERBB4</i>	<i>HNF1A</i>	<i>MLH1</i>	<i>RET</i>
<i>APC</i>	<i>EZH2</i>	<i>HRAS</i>	<i>MPL</i>	<i>SMAD4</i>
<i>ATM</i>	<i>FBXW7</i>	<i>IDH1</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>SMARCB1</i>
<i>BRAF</i>	<i>FGFR1</i>	<i>JAK2</i>	<i>NPM1</i>	<i>SMO</i>
<i>CDH1</i>	<i>FGFR2</i>	<i>JAK3</i>	<i>NRAS</i>	<i>SRC</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>FGFR3</i>	<i>IDH2</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>STK11</i>
<i>CSF1R</i>	<i>FLT3</i>	<i>KDR</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>TP53</i>
<i>CTNNB1</i>	<i>GNA11</i>	<i>KIT</i>	<i>PTEN</i>	<i>VHL</i>

Applied Biosystems™ TaqMan™ Mutation Detection Assays are available for the genes listed above.

Annexe 3. Liste des gènes ciblés dans le *Ion Ampliseq Colon and Lung Cancers panels*.

Genes

KRAS, EGFR, BRAF, PIK3CA, AKT1, ERBB2, PTEN, NRAS, STK11, MAP2K1, ALK, DDR2, CTNNB1, MET, TP53, SMAD4, FBX7, FGFR3, NOTCH1, ERBB4, FGFR1, and FGFR2

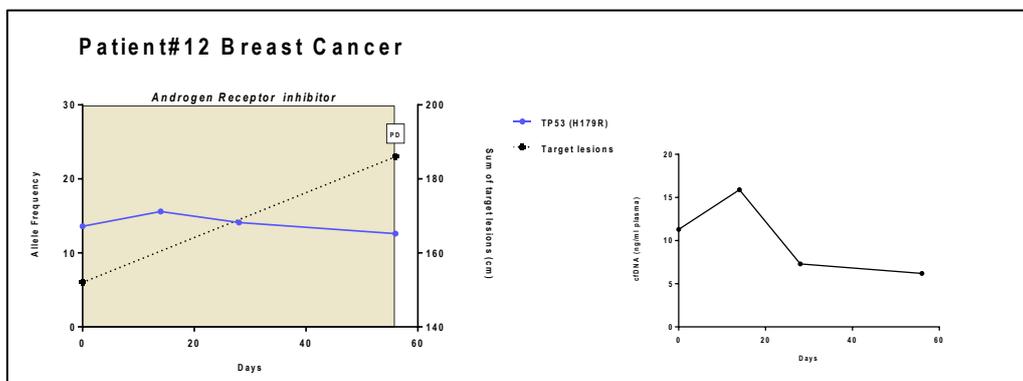
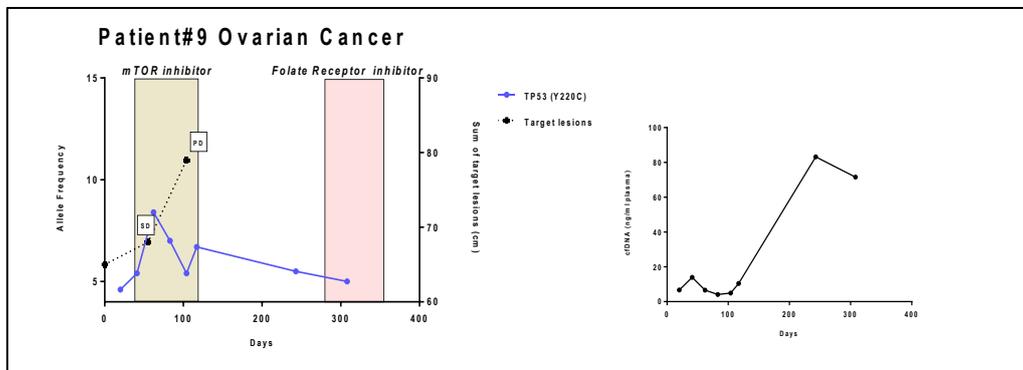
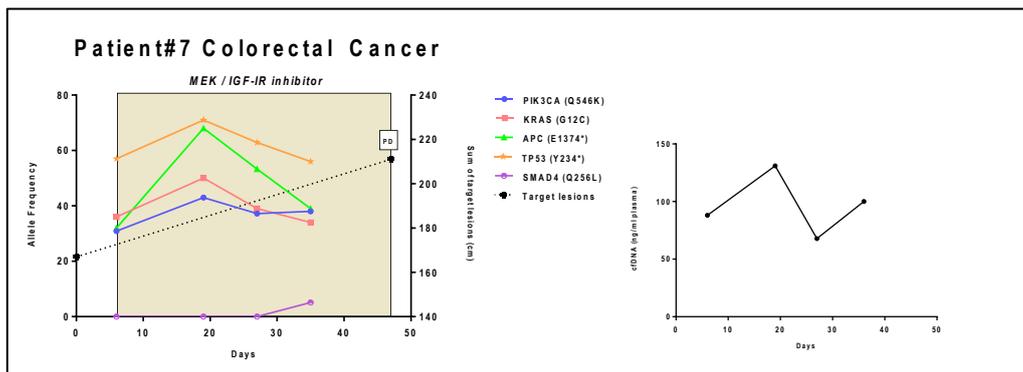
Annexe 4. Cinétiques de FA pour l'ensemble des patients analysés dans l'étude.

Les fréquences alléliques de chacune des mutations dans l'ADNct sont représentées sur l'axe gauche en ordonnée.

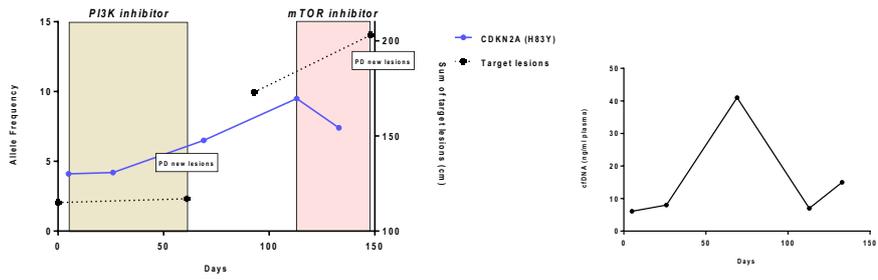
La somme des lésions cibles sur le scanner est représentée sur l'axe droit des ordonnées.

SD : Stable Disease ou maladie stable. PD : Progressive disease ou progression tumorale.

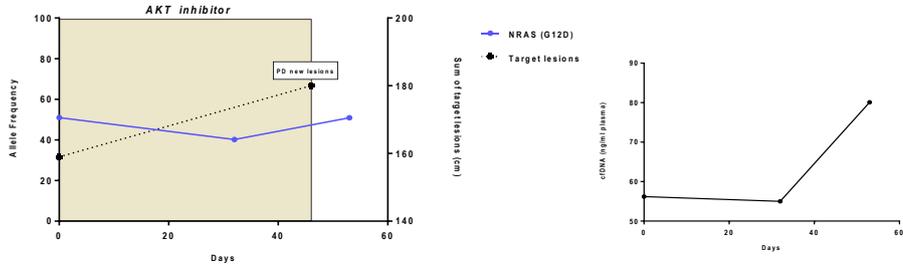
Le carré coloré représente la période pendant laquelle le patient reçoit le traitement ciblé. Le second graphe décrit l'évolution des concentrations d'ADNct au cours du traitement.



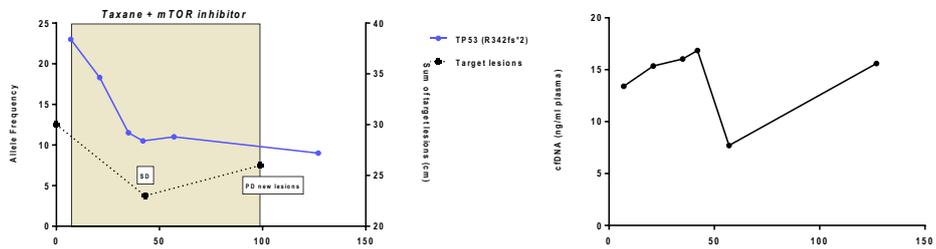
Patient#14 Bladder Cancer

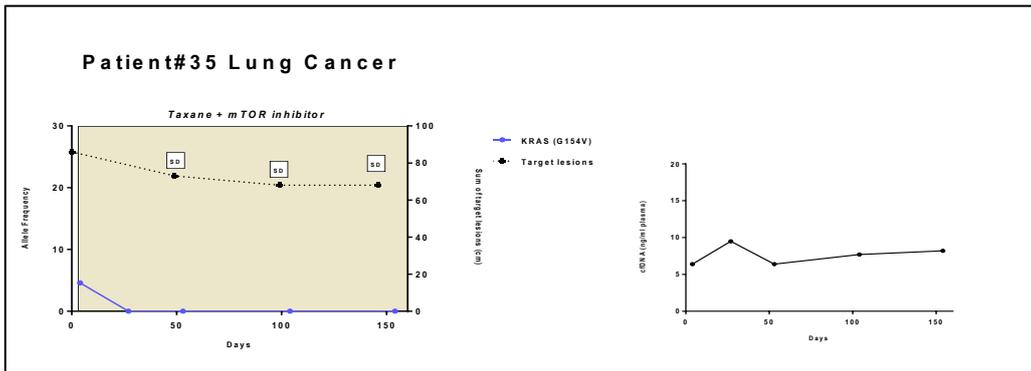
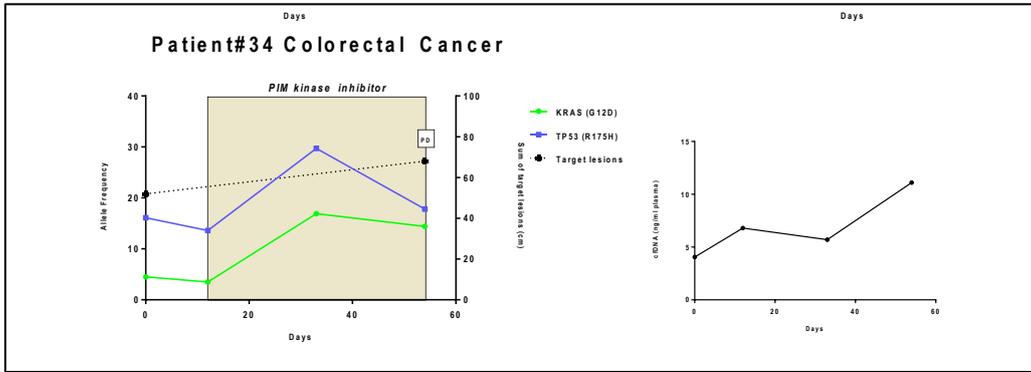
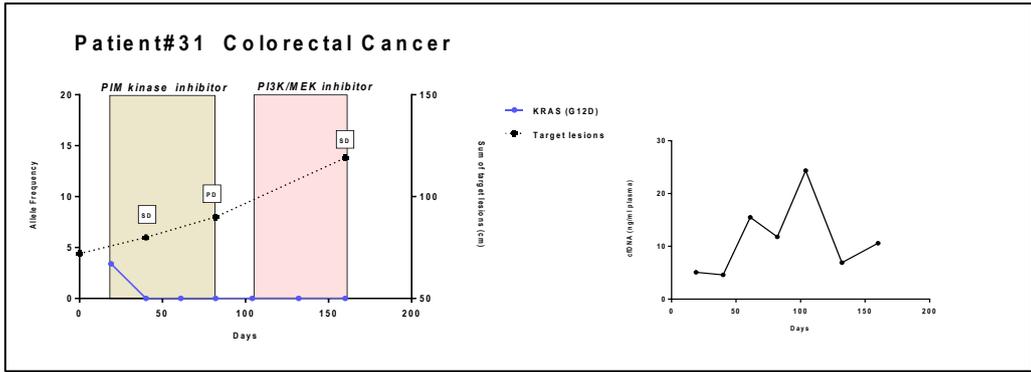


Patient#15 Colorectal Cancer

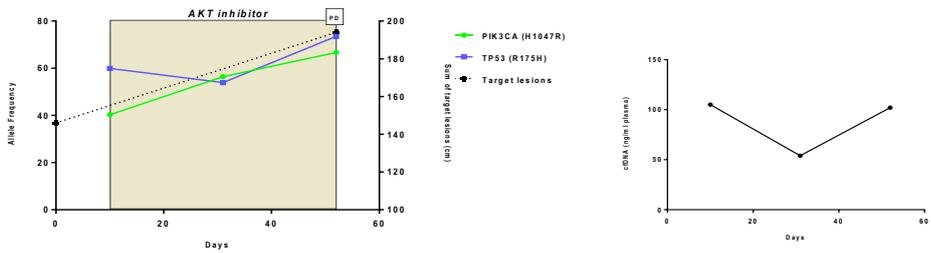


Patient#17 Breast Cancer

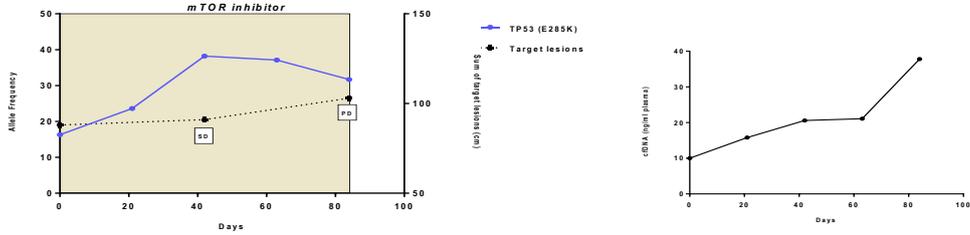




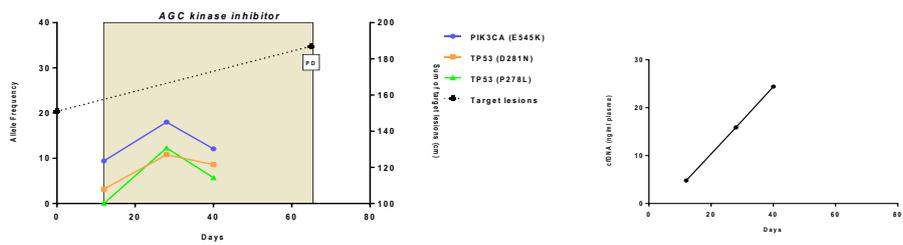
Patient#36 Colorectal Cancer



Patient#37 Kidney Cancer



Patient#38 Bladder Cancer



Thèse de Doctorat

Jean-Sébastien FRENEL

Evaluation de l'ADN tumoral circulant (ADNct) comme biomarqueur de réponse aux thérapies ciblées développées en phase précoce en oncologie

Serial next-generation sequencing of circulating cell-free DNA evaluating tumor clone response to molecularly targeted early phase drug administration.

Résumé

De l'ADN libre circulant (ADNc) dérivant de la tumeur peut être isolé dans le plasma des patients présentant un cancer. Cet ADNc tumoral (ADNct) permet un accès indirect à la tumeur puisqu'il porte les mêmes caractéristiques génétiques et épigénétiques et représente une biopsie liquide. Nous avons évalué l'intérêt du séquençage ciblé de l'ADNct comme biomarqueur de réponse à des thérapies ciblées développées en phase précoce en oncologie. Dans la première partie de ce travail, nous avons évalué les mutations identifiables par séquençage de l'ADNct d'une cohorte de 39 patients recevant un traitement anti-cancéreux dans le cadre d'un essai thérapeutique de phase I. Un total de 157 échantillons de plasma a été séquençé avec une couverture moyenne de 1685x. A l'initiation du traitement, 23 des 39 patients (59%) avaient au moins une mutation identifiable dans l'ADNct. Parmi les 44 mutations identifiées, *TP53*, *PIK3CA* et *KRAS* étaient les gènes les plus fréquemment mutés avec des fréquences de 41%, 20% et 18% respectivement. Dans un second temps, l'ADNc des patients ayant des mutations identifiées a été collecté et séquençés tous les mois au cours du traitement jusqu'à progression. Parmi les 23 patients, 13 ont reçu une thérapie ciblant directement l'anomalie moléculaire identifiée. Le suivi longitudinal des mutations identifiées dans l'ADNct et la dynamique des fréquences alléliques pendant le traitement a mis en évidence des variations associées à la réponse thérapeutique. Par ailleurs, pour les patients présentant plusieurs mutations identifiées dans un même échantillon d'ADNct, le suivi de ces mutations a mis en évidence la présence de clones évoluant de manière discordante au cours du traitement. Les variations quantitatives des fréquences alléliques des mutations dans l'ADNct étaient associées au temps jusqu'à progression sous traitement. L'ADNct est un biomarqueur d'intérêt pour le développement des thérapies ciblées en oncologie fait l'objet de nombreux développements en oncologie qui seront discutés dans ce travail.

Mots clés : ADN circulant tumoral, ADNct, biomarqueur, essai de phase précoce

Abstract

Circulating cell free DNA (ccDNA) deriving from tumor can be isolated in plasma of cancer patients. This circulating tumor DNA (ctDNA) shared the same genetics and epigenetics characteristics with the tumor and represents virtually a liquid biopsy. We evaluated whether targeted next-generation sequencing (NGS) of circulating tumor DNA (ctDNA) could be used for patient selection and as a tumor clone response biomarker in 39 patients with advanced cancers participating in early-phase clinical trials of targeted drugs. Overall, 159 plasma samples were sequenced with a mean sequencing coverage achieved of 1,685X across experiments. At trial initiation (C1D1), 23 of 39 (59%) patients had at least one mutation identified in cfDNA. Out of the 44 mutations identified at C1D1, *TP53*, *PIK3CA* and *KRAS* were the top three mutated genes identified, with 18 (41%), nine (20%), eight (18%) different mutations, respectively. In the second part of this work, we performed sequential NGS of ctDNA for the 23 patients with cfDNA mutation identified at C1D1. The monitoring of mutation allele frequency (AF) in consecutive plasma samples during treatment with targeted drugs demonstrated potential treatment associated clonal responses. Longitudinal monitoring of cfDNA samples with multiple mutations indicated the presence of separate clones behaving discordantly. Molecular changes at cfDNA mutation level were associated with time to disease progression. Targeted NGS of ctDNA has potential clinical utility to monitor the delivery of targeted therapies and future directions are discussed.

Key Words : circulating tumor DNA, ctDNA, biomarker, early phase clinical trials